

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAILSON HENNEBERG

**ESTUDO DO EFEITO ANTIOXIDANTE DE POLIFENÓIS EM ERITRÓCITOS DE
PACIENTES DE HEMOGLOBINA S**

CURITIBA

2013

RAILSON HENNEBERG

**ESTUDO DO EFEITO ANTIOXIDANTE DE POLIFENÓIS EM ERITRÓCITOS DE
PACIENTES DE HEMOGLOBINA S**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná,

Orientadora: Prof. Dra Maria Suely Soares Leonart

Co-Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo José do Nascimento

CURITIBA

2013

Henneberg, Railson

Estudo do efeito antioxidante de polifenóis em eritrócitos de portadores de hemoglobina S / Railson Henneberg – Curitiba, 2013. 181 f. : il.(algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Maria Suely Soares Leonart
Coorientador: Professor Dr. Aguinaldo José do Nascimento
Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Anemia falciforme. 2. Haplótipos. 3. Estresse oxidativo. 4. Flavonoides I. Leonart, Maria Suely Soares. II. Nascimento, Aguinaldo José do. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.


CDD 616.1527


TERMO DE APROVAÇÃO

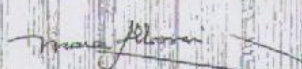
RAILSON HENNEBERG

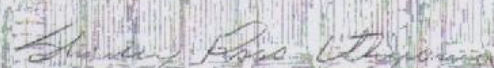
Título: ESTUDO DO EFEITO ANTIOXIDANTE DE POLIFENÓIS EM ERITRÓCITOS DE PORTADORES DE HEMOGLOBINA S


Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.


Prof.ª Dr.ª Maria Suely Soares Leonart
Orientadora


Prof.ª Dr.ª Eliana Mitsuko Tomimatsu Shimauti
Universidade Estadual de Maringá


Prof.ª Dr.ª Mara Albanei Dudeque Pianovski
Universidade Federal do Paraná


Prof.ª Dr.ª Shirley Ramos da Rosa Utiyama
Universidade Federal do Paraná


Obdulio Gomes Miguel
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 21 de fevereiro de 2013.

A minha esposa Andressa, ao meu filho João,
aos meus pais e irmãos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela inspiração e a força concedida durante estes quatro anos de trabalho.

À minha esposa Andressa, pela ajuda nos momentos difíceis, pelo contínuo encorajamento com suas palavras de motivação e conforto. Te amo!!

Ao meu filho João, pelo amor e alegria que me proporciona diariamente.

Aos meus pais, João e Rute, que sempre acreditaram em mim, e que sempre estão presentes na minha vida.

Aos meus irmãos, sempre com palavras de motivação durante estes quatro anos.

À minha orientadora Professora Maria Suely, pela amizade e pelo conhecimento que foram fundamentais para a conclusão do meu trabalho.

Ao meu co-orientador Professor Aguinaldo José do Nascimento, “craque” nas análises estatísticas, sempre disponível e disposto, tornou-se mais que um orientador, um amigo.

As grandes amigas Aline Emmer e Priscila Hermann, que foram peças-chaves na padronização das técnicas do trabalho e me ajudaram muito durante todo o doutorado.

Aos professores Geraldo Picheth, Fabiane Rego e Cinthia Picheth que além da ajuda e orientações, abriram as portas dos seus laboratórios para a realização das técnicas de biologia molecular do trabalho.

Aos amigos Henrique e Isabella, doutorandos do Laboratório de Bioquímica Clínica, que me ajudaram nas trabalhosas técnicas de PCR e restrição.

Ao professor Michel Otuki, que me incentivou e ajudou na realização da técnica das ERO.

Ao Daniel e ao “Bauru”, doutorandos do laboratório de Farmacologia da UFPR que auxiliaram na padronização da técnica da ERO.

A Cinthia e a Ligia, farmacêuticas do Hemepar que foram importantíssimas para a coleta do material dos pacientes com anemia falciforme. Minha eterna gratidão.

A professora Shirley, amiga, que foi fantástica nas dicas e correções realizadas na qualificação do trabalho.

À Giorgio Baldanzi, médico hematologista do Hemepar, pela ajuda no trabalho.

Aos pacientes de anemia falciforme e seus familiares, pela permissão na coleta de sangue, material precioso para a realização da pesquisa.

A todos os doadores voluntários que contribuíram com a pesquisa.

Aos amigos do Doutorado em Ciências Farmacêuticas, pela ajuda e força no período das aulas.

Aos coordenadores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo incentivo que sempre me deram para a realização do meu doutorado.

*“Porque melhor é a sabedoria do que
os rubis; e tudo o que
mais se deseja não se pode comparar
com ela”.*

Provérbios 8:11

RESUMO

A doença falciforme resulta de uma alteração genética que leva a distúrbios estruturais da hemoglobina e, conseqüentemente, da membrana do eritrócito e ao estresse oxidativo. O presente trabalho teve como objetivo correlacionar os parâmetros hematológicos com o status oxidativo e a ação protetora de flavonoides em eritrócitos de pacientes de anemia falciforme em seus haplótipos. Foram estudados 29 pacientes com anemia falciforme (grupo SS) atendidos no Centro de Hematologia e Hematoterapia do Paraná (HEMEPAR), submetidos à terapêutica com hidroxureia (0,5 a 1,0 g/dia) e 15 indivíduos considerados normais (grupo AA). Foram determinados os haplótipos do *cluster* β -globínico e a concentração de hemoglobina fetal (HbF) dos pacientes do grupo SS. A formação das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), porcentagem de hemólise, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), glutatona reduzida (GSH), metahemoglobina e glicose 6-fosfato desidrogenase (G6-PD) foram analisadas no estado basal e pela ação de dois agentes oxidantes (*t*-BHP e AAPH) tanto no grupo SS quanto no grupo AA. No grupo SS, observou-se o predomínio do haplótipo BAN (70%) em relação ao BEN (25,8%), em concordância com outros estudos realizados no Brasil em estados no quais houve tráfico de escravos das mesmas regiões da África. Foi encontrado 1 paciente com o haplótipo SEN. No grupo SS, a hemoglobina fetal basal mostrou-se elevada ($10,9 \pm 8,2\%$); houve maior tendência à oxidação demonstrada pela formação de metahemoglobina no estado basal (AA = $3,44 \pm 0,38\%$; SS = $4,45 \pm 1,10\%$) e sob a ação de *t*-BHP (1mmol/l) (AA = $5,52 \pm 1,77\%$; SS = $10,15 \pm 4,12\%$); TBARS após ação de *t*-BHP (2 mmoles/l) (AA = $177,13 \pm 76,44$ SS = $374,18 \pm 144,08$ nmoles/gHb); não houve alterações nos níveis de GSH no estado basal (AA = $7,94 \pm 1,38$ mU/gHb; SS = $7,78 \pm 2,29$ mU/gHb), mas houve consumo de GSH após ação de *t*-BHP (2 mmoles/l) (AA = $0,50 \pm 0,36$; SS = $1,02 \pm 0,84$ mU/gHb). Observou-se ainda, atividade aumentada de G6-PD no estado basal (AA = $6,39 \pm 0,90$; SS = $13,01 \pm 4,75$ mU/gHb) e seu maior consumo após adição de *t*-BHP (3 mmoles/l) (AA = $4,99 \pm 0,70$; SS = $5,25 \pm 2,84$ mU/gHb). Em subgrupos formados pelos haplótipos BEN/BAN (n=11), BAN/BAN (n=15) e BEN/BEN (n=2) não se encontrou diferenças significativas no comportamento oxidativo. Em concentrações que variaram entre 30 a 200 μ moles/l, os flavonoides quercetina, rutina, miricetina e hesperidina foram eficientes na proteção da formação de ERO, TBARS e hemólise, sem contudo mostrarem efetividade na proteção contra o estresse oxidativo ao se analisar níveis de metehemoglobina, consumo de GSH e atividades de G6-PD, sem diferenças entre os subgrupos estudados. Os resultados indicaram tendência à exacerbação do processo oxidativo em eritrócitos de pacientes com anemia falciforme, sem diferenças entre os subgrupos BEN/BAN, BAN/BAN e BEN/BEN. No entanto, os eritrócitos do paciente com o haplótipo SEN/SEN mostraram indícios de maior resistência ao estresse oxidativo. Os flavonoides apresentaram proteção ao estresse oxidativo na membrana eritrocitária (quercetina>rutina>miricetina>hesperidina) como verificado pelos valores de ERO, hemólise e TBARS. Os resultados obtidos para metahemoglobina, GSH e G6-PD não indicaram mesma proteção, o que poderia ser explicado pela pequena penetração dos mesmos no citosol do eritrócito. Pela comparação entre os resultados para os subgrupos, a variabilidade genética não é fator que tenha influência sobre a resposta dos flavonoides. O uso da hidroxureia pode ter influenciado os resultados encontrados neste trabalho, visto que a formação de ERO

foi compatível com a normalidade, em discordância com outros trabalhos que citam valores até duas vezes maiores em eritrócitos de pacientes com anemia falciforme. A caracterização do polimorfismo do complexo gênico da globina β^s associada ao estudo do efeito protetor de flavonoides sobre o estresse oxidativo em eritrócitos de pacientes de anemia falciforme abre novas perspectivas para a melhoria da qualidade de vida destes pacientes, incluindo o tratamento terapêutico e nutracêutico com antioxidantes.

Palavras-chave: anemia falciforme, haplótipos, estresse oxidativo, flavonoides.

ABSTRACT

Sickle cell disease stems from a genetic alteration that leads to structural disorders of hemoglobin, erythrocyte membrane protein, and oxidative stress. The aim of the present work was to correlate the hematological parameters with the oxidative status and protective action of flavonoids in red cells of patients with sickle cell anemia in their haplotypes. We studied 29 patients with sickle cell anemia (SS) attended at the center of Hematotherapy and Hematology of Paraná (HEMEPAR), undergoing therapy with hydroxyurea (0.5 to 1.0 g/day) and 15 individuals considered normal (AA group). It were determined the haplotypes of the cluster β -globínico and the concentration of fetal hemoglobin (Fhb) in patients with sickle cell anemia. The formation of reactive oxygen species (ROS), percentage of hemolysis, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), reduced glutathione (GSH), methemoglobin and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6-PD) were analyzed in the basal state and under the action of two oxidizing agents (*t*-BHP and AAPH). It was observed in the studied population the predominance of the BAN haplotype (70%) compared to BEN (25.8%), in agreement with other studies carried out in Brazil in States in which there was slave traffic from the same regions of Africa. It was found one patient with the SEN haplotype. In the SS group, the basal fetal hemoglobin was high ($10.9 \pm 8.2\%$); there has been greater tendency to oxidation demonstrated by the formation of methemoglobin in basal state (AA = 3.44 ± 0.38 ; SS = $4.45 \pm 1.10\%$), and under the action of *t*-BHP (1mmole/l) (AA = 5.52 ± 1.77 ; SS = $10.15 \pm 4.12\%$); TBARS after action of *t*-BHP (2 mmole/l) (AA = 177.13 ± 76.44 ; SS = 374.18 ± 144.08 nmole/gHb); there were no changes in the levels of GSH in the basal state (AA = 7.94 ± 1.38 ; SS = 7.78 ± 2.29 mU/gHb), but there was consumption of GSH after action of *t*-BHP (2 mmol/l) (AA = 0.50 ± 0.36 ; SS = 1.02 ± 0.84 μ mole/gHb). There was also increased activity of G6-PD in the basal state (AA = 6.39 ± 0.90 ; SS = 13.01 ± 4.75 mU/gHb) and its higher consumption after addition of *t*-BHP (3 mmol/l) (AA = 4.99 ± 0.70 ; SS = 5.25 ± 2.84 mU/gHb). In subgroups formed by BAN BEN/genotypes (n = 11), BAN BAN/(n = 15) and BEN/BEN (n = 2) no significant differences was found in oxidative behavior. At concentrations that ranged from 30 to 200 μ mole/l, the flavonoids quercetin, rutin, hesperidin, and miricetin were efficient in protecting against formation of ROS, TBARS, and hemolysis, but not have shown effectiveness in protecting against oxidative stress by examining the levels of GSH consumption, methemoglobin, and G6-PD activities, without differences among the subgroups studied. The results indicated a tendency to exacerbation of oxidative process in erythrocytes of patients with sickle cell anemia, without differences between subgroups of BAN/BEN/BAN BAN and BEN/BEN. However, the patient's genotype erythrocytes SEN/SEN showed signs of increased resistance to oxidative stress. The flavonoids have protected erythrocyte membrane against oxidative stress (quercetin > rutina > miricetin > hesperidin) as verified by the values of the ERO, TBARS and hemolysis. The results obtained for methemoglobin, GSH, and G6-PD did not indicate the same protection, which could be explained by the small penetration of the same in the cell cytosol. By comparing the results to the subgroups, it was not

observed behavioral differences, and one cannot indicate the genetic variability as a factor that has influenced. The use of hydroxyurea may have influenced the results found in this work, since the formation of ROS was compatible with normality, in disagreement with other authors mentioning values up to two times higher in erythrocytes of sickle cell anemia patients. Genotypic characterization associated to the study of the protective effect of flavonoids on oxidative stress of erythrocytes in patients with sickle cell disease opens new prospects for the improvement of the quality of life of these patients, including therapeutic and nutraceutical treatment with antioxidants.

Keywords: sickle cell anemia, haplotypes, oxidative stress, flavonoids.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ESTRUTURA DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA. DISPOSIÇÃO DAS PROTEÍNAS INTEGRAIS BANDA 3, ANQUIRINA E A FRAÇÃO β DA ESPECTRINA.....	28
FIGURA 2 -	VIA METABÓLICA DE EMBDEN-MEYERHOF.....	33
FIGURA 3 -	VIA METABÓLICA DA HEXOSE MONOFOSFATO.....	34
FIGURA 4 -	ENZIMAS QUE PARTICIPAM DA VIA HEXOSE MONOFOSFATO: (1) GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE; (2) GLUTATIONA REDUTASE; (3) FOSFOGLUCONATO DESIDROGENASE; (4) RIBULOSEFOSFATO EPIMERASE; (5) RIBOSEFOSFATO ISOMERASE E (7) TRANSALDOSE.....	36
FIGURA 5 -	VIA DE REDUÇÃO DA METAHEMOGLOBINA. PRINCIPAIS ENZIMAS QUE PARTICIPAM DA VIA: RFR(FLAVINA REDUTASE); RB5 (CITOCROMO B5 REDUTASE) E B5 (CITOCROMO B5).....	37
FIGURA 6 -	ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS GENES ALFA E BETA E A EXPRESSÃO DOS VÁRIOS TIPOS DE HEMOGLOBINA EXPRESSOS DURANTE O PERÍODO FETAL E ADULTO.....	38
FIGURA 7 -	MAPA GENÔMICO DO GENE BETA.....	38
FIGURA 8 -	ENZIMAS DE RESTRIÇÃO QUE DETERMINAM OS HAPLÓTIPOS DO GENE BETA.....	42
FIGURA 9 -	FISIOPATOLOGIA DA VASOOCCLUSÃO.....	47
FIGURA 10 -	REDUÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DO ÓXIDO NITRÍCO PELA HEMÓLISE INTRAVASCULAR.....	54
FIGURA 11 -	ESTRUTURA GERAL DOS FLAVONOIDES.....	56
FIGURA 12 -	MECANISMO DE SEQUESTRAMENTO DE ELÉTRONS PELA QUERCETINA.....	58
FIGURA 13 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO <i>t</i> -BHP (<i>tert</i> -BUTIL HIDROPERÓXIDO).....	60
FIGURA 14 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO AAPH.....	61
FIGURA 15 -	ESTRUTURA QUÍMICA DA QUERCETINA.....	62
FIGURA 16 -	ESTRUTURA QUÍMICA DA RUTINA.....	63
FIGURA 17 -	ESTRUTURA QUÍMICA DA HESPERIDINA.....	63
FIGURA 18 -	ESTRUTURA QUÍMICA DA MIRICETINA.....	64
FIGURA 19 -	NOVOS ESQUEMAS TERAPÊUTICOS PARA O TRATAMENTO DA ANEMIA FALCIFORME.....	67
FIGURA 20 -	SÍTIOS DE AÇÃO DAS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO AO LONGO DO GENE BETA.....	75
FIGURA 21 -	PRÍNCÍPIO DO MECANISMO DE FUNCIONAMENTO DA SONDA DCFH-DA.....	80
FIGURA 22 -	REAÇÃO UTILIZADA PARA DETECÇÃO DE MDA EM PLASMA HUMANO.....	83
FIGURA 23 -	REAÇÃO ENTRE O DNTB E A GSH.....	86
FIGURA 24 -	PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DO PRODUTO DE PCR DA REGIÃO IVS2 DO GENE GAMA GUANINA. O PRODUTO (AMPLICON) CONTÉM 761 PARES DE BASE. GEL DE AGAROSE 1,5% EM TAMPÃO TBE 1X.....	90

FIGURA 25 -	PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DO PRODUTO DE PCR DAS REGIÕES DO PSEUDOGENE ϵ (760 pb), ENTRE O GENE EMBRIONÁRIO ϵ E O GENE GAMA GUANINA (655 pb), NO GENE GAMA ADENINA (328 pb) E ENTRE OS GENES GAMA GUANINA E GAMA ADENINA (960 pb). GEL DE AGAROSE 1,5% EM TAMPÃO TBE 1X.	91
FIGURA 26 -	PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DO PRODUTO DE PCR DA EXTREMIDADE 5' DO GENE $\Psi\beta$ (794 pb), DA EXTREMIDADE 3' DO GENE $\Psi\beta$ (620 pb), E NA EXTREMIDADE 5' DO GENE BETA (638 pb). GEL DE AGAROSE 1,5% EM TAMPÃO TBE 1X.....	92
FIGURA 27 -	PERFIL ELETROFÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO. GEL DE AGAROSE 3,5% EM TAMPÃO TBE 1X.....	93
FIGURA 28 -	PERFIL ELETROFÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO. GEL DE POLIACRILAMIDA a 10% EM TAMPÃO TBE 1X.....	94
FIGURA 29 -	PERFIL ELETROFÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO. GEL DE POLIACRILAMIDA a 10% EM TAMPÃO TBE 1X.....	95
FIGURA 30 -	PERFIL ELETROFÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO. GEL DE POLIACRILAMIDA a 10% EM TAMPÃO TBE 1X.....	95
FIGURA 31 -	PERFIL ELETROFÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO. GEL DE POLIACRILAMIDA a 10% EM TAMPÃO TBE 1X.....	96
FIGURA 32 -	PERFIL ELETROFÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO. GEL DE POLIACRILAMIDA a 10% EM TAMPÃO TBE 1X.....	96
FIGURA 33 -	PERFIL ELETROFÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO. GEL DE POLIACRILAMIDA a 10% EM TAMPÃO TBE 1X.....	97
FIGURA 34 -	PERFIL ELETROFÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO. GEL DE POLIACRILAMIDA a 10% EM TAMPÃO TBE 1X.....	98
FIGURA 35 -	PERFIL ELETROFÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO. GEL DE POLIACRILAMIDA a 10% EM TAMPÃO TBE 1X.....	98
FIGURA 36 -	PERFIL ELETROFÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO. GEL DE POLIACRILAMIDA A 10% EM TAMPÃO TBE 1X.....	99
FIGURA 37 -	PERFIL ELETROFÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO. GEL DE AGAROSE A 3,5% EM TAMPÃO TBE 1X.	100
FIGURA 38 -	PERFIL ELETROFÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO. GEL DE AGAROSE A 3,5% EM TAMPÃO TBE 1X.	100
FIGURA 39 -	PERFIL ELETROFÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO. GEL DE AGAROSE	

	A 3,5% EM TAMPÃO TBE 1X.	101
FIGURA 40 -	PERFIL ELETROFÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO. GEL DE AGAROSE A 3,5% EM TAMPÃO TBE 1X.....	101
FIGURA 41 -	PERFIL ELETROFÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO. GEL DE POLIACRILAMIDA A 10% EM TAMPÃO TBE 1X.....	102
FIGURA 42 -	PARÂMETROS HEMATIMÉTRICOS OBTIDOS EM GRUPO CONTROLE (AA) E EM GRUPO DE PACIENTES DE ANEMIA FALCIFORME (SS), ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS, ATENDIDOS NO HEMEPAR, CURITIBA, PR, 2011-2012.....	104
FIGURA 43 -	VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO E CONTAGEM DE PLAQUETAS OBTIDOS EM GRUPO CONTROLE (AA) E EM GRUPO DE PACIENTES DE ANEMIA FALCIFORME (SS), ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS, ATENDIDOS NO HEMEPAR, CURITIBA, PR, 2011.....	105
FIGURA 44 -	PRODUÇÃO DE ERO EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS SUBMETIDOS AÇÃO PROTETORA DA QUERCETINA (30,50 e 100 μ moles/l) COM POSTERIOR AÇÃO OXIDANTE DO <i>t</i> -BHP.....	108
FIGURA 45 -	PRODUÇÃO DE ERO EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS SUBMETIDOS AÇÃO PROTETORA DA RUTINA (30,50 e 100 μ moles/l) COM POSTERIOR AÇÃO OXIDANTE DO <i>t</i> -BHP.....	109
FIGURA 46 -	PRODUÇÃO DE ERO EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS SUBMETIDOS AÇÃO PROTETORA DA MIRICETINA (30,50 e 100 μ moles/l) COM POSTERIOR AÇÃO OXIDANTE DO <i>t</i> -BHP.....	110
FIGURA 47 -	PRODUÇÃO DE ERO EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS SUBMETIDOS AÇÃO PROTETORA DA HESPERIDINA (30,50 e 100 μ moles/l) COM POSTERIOR AÇÃO OXIDANTE DO <i>t</i> -BHP.....	111
FIGURA 48 -	PORCENTAGEM DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME, INCUBADOS COM MIRICETINA, QUERCETINA, RUTINA E HESPERIDINA NAS CONCENTRAÇÕES DE 50 e 100 μ moles/l, SUBMETIDOS À AÇÃO HEMOLISANTE DO AAPH 100 mmoles/l.....	113
FIGURA 49 -	PORCENTAGEM DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS, INCUBADOS COM QUERCETINA, RUTINA, MIRICETINA E HESPERIDINA 50 E 100 μ moles/l, SUBMETIDOS À AÇÃO HEMOLISANTE DO AAPH 100 μ moles/l.....	114
FIGURA 50 -	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (nmoles/g de hemoglobina) EM	

	ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME SUBMETIDOS A AÇÃO OXIDANTE DO <i>t</i> -BHP 2mmoles/l APÓS A INCUBAÇÃO COM OS FLAVONOIDES NAS CONCENTRAÇÕES DE 50 E 100 μ moles/l.	115
FIGURA 51 -	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (nmoles/g de hemoglobina) EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADO EM SEUS HAPLÓTIPOS (BEN/BAN (n=11); BAN/BAN (n=15), BEN/BEN (n=2); SEN/SEN (n=1) SUBMETIDOS A AÇÃO OXIDANTE DO <i>t</i> -BHP 2mmoles/l APÓS A INCUBAÇÃO COM QUERCETINA 50 e 100 μ moles/l.....	117
FIGURA 52 -	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (nmoles/g de hemoglobina) EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADO EM SEUS HAPLÓTIPOS (BEN/BAN (n=11); BAN/BAN (n=15), BEN/BEN (n=2); SEN/SEN (n=1) SUBMETIDOS A AÇÃO OXIDANTE DO <i>t</i> -BHP 2 mmoles/l APÓS A INCUBAÇÃO COM RUTINA 50 e 100 μ moles/l.....	118
FIGURA 53 -	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (nmoles/g de hemoglobina) EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADO EM SEUS HAPLÓTIPOS (BEN/BAN (n=11); BAN/BAN (n=15), BEN/BEN (n=2); SEN/SEN (n=1) SUBMETIDOS A AÇÃO OXIDANTE DO <i>t</i> -BHP 2 mmoles/l APÓS A INCUBAÇÃO COM MIRICETINA 50 e 100 μ moles/l.....	118
FIGURA 54 -	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (nmoles/g de hemoglobina) EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADO EM SEUS HAPLÓTIPOS (BEN/BAN (n=11);BAN/BAN (n=15),BEN/BEN (n=2);SEN/SEN(n=1) SUBMETIDOS A AÇÃO OXIDANTE DO <i>t</i> -BHP2mmoles/l APÓS A INCUBAÇÃO COM HESPERIDINA 50 e 100 μ moles/l.....	119
FIGURA 55 -	PORCENTAGEM DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME NO ESTADO BASAL, SUBMETIDOS A AÇÃO OXIDANTE DO T-BHP (1mmol/l) E DOS FLAVONOIDES.....	120
FIGURA 56 -	PORCENTAGEM DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS (BEN/BAN (n=11); BAN/BAN (n=15), BEN/BEN (n=2); SEN/SEN (n=1) SUBMETIDOS A AÇÃO OXIDANTE DO <i>t</i> -BHP 1mmoles/l APÓS A INCUBAÇÃO COM QUERCETINA 50 E 100 μ moles/l.....	121
FIGURA 57 -	PORCENTAGEM DE METAHEMOGLOBINA EM	

	ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS (BEN/BAN (n=11); BAN/BAN (n=15), BEN/BEN (n=2); SEN/SEN (n=1) SUBMETIDOS A AÇÃO OXIDANTE DO <i>t</i> -BHP 1 mmoles/l APÓS A INCUBAÇÃO COM RUTINA 50 e 100 μmoles/l.....	122
FIGURA 58 -	PORCENTAGEM DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS (BEN/BAN (n=11); BAN/BAN (n=15), BEN/BEN (n=2); SEN/SEN (n=1) SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DO <i>t</i> -BHP 1mmoles/l APÓS A INCUBAÇÃO COM HESPERIDINA 50 E 100 mmoles/l.....	122
FIGURA 59 -	PORCENTAGEM DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS (BEN/BAN (n=11); BAN/BAN (n=15), BEN/BEN (n=2); SEN/SEN (n=1) SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DO <i>t</i> -BHP 1mmoles/l APÓS A INCUBAÇÃO COM MIRICETINA 50 E 100 μmoles/l.....	123
FIGURA 60 -	CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME NO ESTADO BASAL, TRATADOS COM MIRICETINA, QUERCETINA, RUTINA E HESPERIDINA NA CONCENTRAÇÃO DE 200 μmoles/l DE CADA FLAVONOIDE, COM POSTERIOR INCUBAÇÃO COM <i>t</i> -BHP 3 mmoles/l.....	125
FIGURA 61 -	CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS (BEN/BAN (n=11); BAN/BAN (n=15), BEN/BEN (n=2); SEN/SEN (n=1) NO ESTADO BASAL, SUBMETIDOS A AÇÃO OXIDANTE DO <i>t</i> -BHP 3 mmoles/l E APÓS A INCUBAÇÃO COM MIRICETINA, QUERCETINA, RUTINA E HESPERIDINA 200 μmoles/l.....	126
FIGURA 62 -	CONCENTRAÇÃO DE G6-PD EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E EM PACIENTES DE ANEMIA FALCIFORME SUBMETIDOS AO ESTRESSE OXIDATIVO PELO <i>t</i> -BHP (3 mmoles/l) APÓS A INCUBAÇÃO COM MIRICETINA, QUERCETINA, RUTINA E HESPERIDINA 200 μmoles/l.....	128
FIGURA 63 -	CONCENTRAÇÃO DE G6-PD EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS SUBMETIDOS AO ESTRESSE OXIDATIVO PELO <i>t</i> -BHP APÓS A INCUBAÇÃO COM MIRICETINA, QUERCETINA, RUTINA E HESPERIDINA.....	129
FIGURA 64 -	ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONOIDES.....	150

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 -	CARACTERÍSTICAS DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO).....	49
QUADRO 2 -	CARACTERÍSTICAS DAS PRINCIPAIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO (ERN) E CLORO	51
QUADRO 3 -	CONCENTRAÇÕES DOS POLIFENÓIS UTILIZADAS NO PROJETO.....	74
QUADRO 4 -	SEQUÊNCIA DOS <i>PRIMERS</i> PARA OS DIFERENTES SÍTIOS DE RESTRIÇÃO.....	76
QUADRO 5 -	CONDIÇÕES PARA A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	77
QUADRO 6 -	PROGRAMAÇÃO DE TEMPO E TEMPERATURA PARA O TERMOCICLADOR.....	77
QUADRO 7 -	TEMPERATURA DE <i>MELTING</i> DOS DIFERENTES SÍTIOS DE RESTRIÇÃO.....	78
QUADRO 8 -	ANÁLISE DOS AMPLICONS E O TAMANHO DOS FRAGMENTOS COM E SEM OS SÍTIOS DE RESTRIÇÃO...	78
QUADRO 9 -	CONDIÇÕES DE ENSAIO PARA A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	79
QUADRO 10 -	PRINCIPAIS HAPLÓTIPOS DO COMPLEXO DO GENE B ^S DEFINIDOS PELA AÇÃO DE 8 ENZIMAS DE RESTRIÇÃO..	97
QUADRO 11 -	DISTRIBUIÇÃO DOS HAPLÓTIPOS GENÉTICOS DE PACIENTES PACIENTES DE ANEMIA FALCIFORME EM VÁRIOS ESTUDOS REALIZADOS NO BRASIL.....	134
QUADRO 12 -	PREVALÊNCIA (POR 100 HABITANTES) DOS HAPLÓTIPOS B ^S EM DIVERSAS ZONAS GEOGRÁFICAS...	135
QUADRO 13 -	VALORES MÉDIOS DO VCM ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO COM HIDROXIUREIA EM ALGUNS TRABALHOS QUE AVALIARAM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME.....	137
QUADRO 14 -	VALORES MÉDIOS E DESVIOS PADRÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS EM ALGUNS TRABALHOS QUE AVALIARAM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME EM SEUS HAPLÓTIPOS.....	138

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	VALORES MÉDIOS, DESVIOS E ERROS PADRÃO E LIMITES DE CONFIANÇA DOS PARÂMETROS HEMATIMÉTRICOS OBTIDOS EM GRUPO CONTROLE (AA) E EM GRUPO DE PACIENTES DE ANEMIA FALCIFORME (SS) ATENDIDOS NO HEMEPAR, CURITIBA, PR, 2011-2012.....	103
TABELA 2	VALORES MÉDIOS, DESVIOS E ERROS PADRÃO E LIMITES DE CONFIANÇA DA DOSAGEM DE HEMOGLOBINA FETAL EM PACIENTES PACIENTES DE ANEMIA FALCIFORME (SS), DE ACORDO COM DIFERENTES HAPLÓTIPOS.....	106
TABELA 3	PRODUÇÃO DE ERO EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME, ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS, SUBMETIDOS AO ESTRESSE OXIDATIVO PELO <i>t</i> -BHP APÓS AÇÃO DOS FLAVONOIDES.....	107
TABELA 4	MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DA PORCENTAGEM DE HEMÓLISE NOS ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES DE ANEMIA FALCIFORME, ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS.....	112
TABELA 5	MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DE TBARS (nmoles/g DE HEMOGLOBINA) EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS (AA) E PACIENTES PACIENTES DE ANEMIA FALCIFORME (SS) SUBMETIDOS AO ESTRESSE OXIDATIVO PELO <i>t</i> -BHP APÓS A INCUBAÇÃO COM MIRICETINA, QUERCETINA, RUTINA E HESPERIDINA.....	116
TABELA 6	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (nmoles/g de hemoglobina) EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES PACIENTES DE ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE OXIDATIVO PELO <i>t</i> -BHP APÓS A INCUBAÇÃO COM MIRICETINA, QUERCETINA, RUTINA E HESPERIDINA.....	116
TABELA 7	PORCENTAGEM DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME NO ESTADO BASAL, SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DO <i>t</i> -BHP (1mmoles/l) E DOS FLAVONOIDES.....	121
TABELA 8	CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME NO ESTADO BASAL, TRATADOS COM MIRICETINA, QUERCETINA, RUTINA E HESPERIDINA NA CONCENTRAÇÃO DE 200 μ moles/l DE CADA FLAVONOIDE, COM POSTERIOR INCUBAÇÃO COM <i>t</i> -BHP 2 μ moles/l.....	124
TABELA 9	VALORES MÉDIOS DA ATIVIDADE DA G6-PD EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES PACIENTES DE ANEMIA FALCIFORME SUBMETIDOS AO ESTRESSE OXIDATIVO PELO <i>t</i> -BHP APÓS A INCUBAÇÃO COM MIRICETINA, QUERCETINA, RUTINA E HESPERIDINA	

TABELA 10	NAS CONCENTRAÇÕES DE 200 μ moles/l.....	127
	VALORES MÉDIOS DA ATIVIDADE DA G6-PD EM	
	ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES	
	PACIENTES DE ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADO EM	
	SEUS HAPLÓTIPOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE	
	OXIDATIVO PELO <i>t</i> -BHP APÓS A INCUBAÇÃO COM	
	MIRICETINA, QUERCETINA, RUTINA E HESPERIDINA NAS	
	CONCENTRAÇÕES DE 200 μ moles/l.....	129

LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH – 2,2 - azobis (amidinopropano) dihidrocloreto
ATP - adenosina 5´trifosfato
2,3-BPG - 2,3 – bisfosfoglicerato
C - colesterol
CAT - catalase
DCFH-DA - 2,7 – diclorodihidrofluoresceína diacetato
DCFH - 2,7-diclorodihidrofluoresceína (reduzida)
DTNB - ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico
EM - esfingomielina
ERN - espécies reativas de nitrogênio
ERO - espécies reativas de oxigênio
FC - fosfatidilcolina
FE - fosfatidiletanolamina
FI - fosfatidilinositol
FL - fosfolipídeos
FS - fosfatidilserina
GSH - glutatona reduzida
GSH-Px - glutatona peroxidase
GSSG - glutatona oxidada
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
Hb - hemoglobina
Hb A - hemoglobina A
Hb F - hemoglobina fetal
Hb S - hemoglobina S
HCIO - ácido hipocloroso
IC₅₀ – concentração de inibidor necessária para reduzir a resposta pela metade
ICAM-1 - molécula de adesão intercelular-1
LDH - lactato desidrogenase
LO[•] – radical alcóxila derivado de lipídeos
LOO[•] – radical peróxila derivado de lipídeos

Meta-Hb - metahemoglobina

NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NO - óxido nítrico

O₂[•] - radical superóxido

O₃ - ozônio

OH[•] - radical hidroxila

pH - potencial hidrogeniônico

PI - ponto isoelétrico

R[•] – radical alquila (poluentes/drogas)

RO[•] - radical alcoxila (poluentes/drogas)

ROO[•] - radical peroxila (poluentes/drogas)

SOD - superóxido dismutase

***t*-BHP** - *tert*-butil-hidroperóxido

***t*-B[•]** - radical *tert*-butoxila

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1	Membrana eritrocitária.....	26
2.2	Membrana do eritrócito falciforme.....	29
2.3	Metabolismo energético do eritrócito.....	32
2.4	Redução da metahemoglobina.....	36
2.5	Hemoglobina.....	37
2.6	Hemoglobina na anemia falciforme.....	39
2.7	Desnaturação oxidativa da hemoglobina.....	44
2.8	Desnaturação oxidativa da hemoglobina falciforme.....	45
2.9	Polimerização da hemoglobina S e sua relação com a homeostase do ferro na anemia falciforme.....	46
2.10	Estresse oxidativo.....	48
2.11	Estresse oxidativo e anemia falciforme.....	52
2.12	Flavonoides como terapia antioxidante.....	55
2.13	Agentes oxidantes utilizados em modelos experimentais.....	58
2.13.1	<i>Terc</i> -butil-hidroperóxido (<i>t</i> -BHP).....	58
2.13.2	2,2- azobis (amidinopropano) dihidroclorato (AAPH).....	60
2.14	Flavonoides estudados.....	62
2.14.1	Quercetina.....	62
2.14.2	Rutina.....	63
2.14.3	Hesperidina.....	63
2.14.4	Miricetina.....	64
2.15	Terapias no tratamento da anemia falciforme.....	64
2.15.1	Hidroxiureia.....	67
3	OBJETIVOS	71
3.1	Objetivo geral.....	71
3.2	Objetivos específicos.....	71
4	MATERIAL E MÉTODOS	72
4.1	Reagentes.....	72
4.2	Obtenção do material.....	72
4.3	Isolamento dos eritrócitos.....	73
4.4	Tratamento das amostras com os polifenóis testados.....	73
4.5	Tratamento das amostras com as substâncias oxidantes: <i>terc</i> -butilhidroperóxido (<i>t</i> -BHP) e 2,2'azobis (2-metil-propionamidina) dihidrocloro (AAPH).....	74
4.6	Determinações laboratoriais.....	75
4.6.1	Determinação dos haplótipos do “ <i>cluster</i> ” do gene beta.....	75
4.6.1.1	Oligonucleotídeos iniciadores.....	76
4.6.1.2	Reação em cadeia da polimerase.....	76
4.6.1.3	Análise com enzimas de restrição.....	77
4.6.2	Hemograma.....	79
4.6.3	Determinação da concentração de Hemoglobina Fetal.....	79
4.6.4	Deteção de espécies reativas de oxigênio (ERO).....	79
4.6.4.1	Princípio do método.....	79
4.6.4.2	Técnica.....	80
4.6.4.3	Cálculo.....	81

4.6.5	Determinação das porcentagens de hemólise.....	81
4.6.5.1	Princípio do método.....	81
4.6.5.2	Técnica.....	81
4.6.5.3	Cálculo.....	82
4.6.6	Determinação de peroxidação lipídica pela detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	82
4.6.6.1	Princípio do método.....	82
4.6.6.2	Técnica.....	82
4.6.6.3	Cálculo.....	83
4.6.7	Determinação da concentração da metahemoglobina.....	84
4.6.7.1	Princípio do método.....	84
4.6.7.2	Técnica.....	84
4.6.7.3	Cálculo.....	85
4.6.8	Determinação da concentração de glutatona reduzida.....	85
4.6.8.1	Princípio do método.....	85
4.6.8.2	Técnica.....	86
4.6.8.3	Cálculo.....	87
4.6.9	Determinação da atividade enzimática de glicose 6-fosfato desidrogenase (G6-PD).....	87
4.6.9.1	Princípio do método.....	87
4.6.9.2	Preparo da amostra.....	88
4.6.10	Análise estatística dos resultados obtidos.....	89
5	RESULTADOS	90
5.1	Determinação dos haplótipos do “cluster” do gene beta.....	90
5.2	Hemograma.....	103
5.3	Hemoglobina Fetal.....	105
5.4	Detecção de espécies reativas de oxigênio (ERO).....	106
5.5	Porcentagem de hemólise.....	112
5.6	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	114
5.7	Metahemoglobina.....	120
5.8	Glutatona reduzida (GSH)	124
5.9	Determinação de Glicose -6- Fosfato Desidrogenase.....	127
6	DISCUSSÃO	130
6.1	Determinação dos haplótipos do “cluster” do gene beta.....	133
6.2	Hemograma.....	136
6.3	Hemoglobina fetal.....	138
6.4	Espécies reativas de oxigênio(ERO)	143
6.5	Porcentagem de hemólise.....	146
6.6	TBARS.....	149
6.7	GSH/Metahemoglobina.....	153
6.8	Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6-PD).....	157
7	CONCLUSÕES	160
	REFERÊNCIAS	161
	ANEXOS	175
	APÊNDICES	178

1 INTRODUÇÃO

A anemia falciforme é um problema de saúde pública no Brasil embora todos os pacientes da doença apresentem a mesma mutação no gene beta (GAG→GTG, Glu→Val), as características clínicas da doença são muito variáveis. A heterogeneidade clínica dos pacientes com anemia falciforme, em diferentes localidades do mundo, variando de formas leves, quase assintomáticas, a formas incapacitantes ou com alta taxa de mortalidade, têm sido fonte de inúmeras pesquisas (GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2002). Por muitos anos, atribuiu-se ao processo de polimerização da hemoglobina S (HbS), como sendo o principal mecanismo fisiopatológico responsável pelas manifestações clínicas da doença. Mais recentemente, outros fatores envolvidos na fisiopatologia da doença foram descritos, como os haplótipos do *cluster* beta, as associações epigenéticas com a β -talassemia e com a produção de hemoglobina fetal, além de disfunções endoteliais (RUSANOVA *et al.*, 2010). Cinco principais haplótipos têm sido relatados em diferentes regiões do mundo e são relacionados com países e áreas do continente africano ou próximo a este, ligados a grupos populacionais específicos, recebendo as denominações de acordo com os locais de sua origem: BEN, República Centro-Africana ou BAN, SEN, Camarões, Arábia Saudita e Índia (GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2002). A presença do sítio de restrição XmnI no gene γ^G característico dos haplótipos SEN e Índio-Árabe é associado com maior produção de hemoglobina fetal e menor severidade clínica (SANS, 2012).

A disfunção endotelial verificada na anemia falciforme tem sido relacionado ao estado inflamatório crônico, à grande produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), e de nitrogênio (ERN) além de aumento na expressão de moléculas de adesão ao endotélio. O estresse oxidativo crônico constitui fator crítico nos danos a múltiplos órgãos na anemia falciforme. O estudo de terapias antioxidantes para o tratamento da anemia falciforme tem sido alvo de inúmeras pesquisas com o objetivo de diminuir o estado oxidativo nestes pacientes. Os flavonoides são compostos facilmente encontrados na natureza e podem prevenir os danos oxidativos por sua habilidade de sequestrar radicais livres com o radical hidroxil e o ânion superóxido (SANTOS *et al.*, 2012).

Pela complexidade molecular e pela tendência oxidativa relatada na anemia falciforme, considerou-se relevante analisar o efeito antioxidante de quatro flavonoides (quercetina, rutina, hesperidina e miricetina) em eritrócitos de pacientes com anemia falciforme, atendidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR), com o intuito de investigar se estes compostos têm efeito protetor contra o estresse oxidativo e se os haplótipos estudados podem influenciar na resposta aos mesmos. Desta forma, a partir dos resultados deste trabalho, espera-se poder indicar os flavonoides em estudo para serem utilizados em terapia auxiliar no tratamento de pacientes com anemia falciforme.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O eritrócito humano é uma das células mais especializadas. Não possuindo núcleo ou organelas citoplasmáticas como mitocôndrias ou ribossomos, o eritrócito é incapaz de sintetizar proteína, realizar reações oxidativas associadas com mitocôndrias ou sofrer mitose. A célula eritrocitária consiste de uma membrana circundando uma solução de proteínas e eletrólitos, sendo que a hemoglobina é a principal proteína citoplasmática. O restante de seus principais constituintes é representado pelas enzimas necessárias para a produção de energia e para a manutenção da hemoglobina no seu estado reduzido (TELEN; KAUFMAN, 1999)

2.1 MEMBRANA ERITROCITÁRIA

A característica central da estrutura da membrana eritrocitária é uma matriz formada por dupla camada de fosfolípidos, na qual se encontram inseridas moléculas de colesterol ligadas a proteínas denominadas integrais e periféricas. As proteínas periféricas compõem o citoesqueleto, verdadeira malha que constitui uma espécie de concha para o material intracelular. As proteínas integrais penetram ou atravessam a bicamada lipídica e interagem com a porção hidrofóbica das moléculas lipídicas. Entre elas estão as proteínas de transporte, como a banda 3, denominada proteína transportadora de íons e as glicoforinas A, B, C e D, que possuem receptores de membrana e antígenos, os quais participam do reconhecimento célula-célula na extremidade externa e auxiliam na estabilização do citoesqueleto através de ligações com a proteína 4.1 na face interna da membrana (MURADOR, 2007).

A hipótese da bicamada lipídica, proposta pela primeira vez em 1925 e aprimorada por Danielli e Davson em 1935, ainda é amplamente aceita (TELEN, 1998). A membrana eritrocitária representa aproximadamente 1% do peso total do eritrócito e desempenha papel fundamental na manutenção da integridade da célula. Sua estrutura capacita o eritrócito a ter grande flexibilidade, durabilidade e suportar grandes deformações durante as repetidas passagens através da microcirculação. Além disto, desempenha papel importante no metabolismo, por sua seletividade às

enzimas glicolíticas (GALLAGHER, 2006). A presença de ATP não é apenas crucial para a manutenção da forma bicôncava do eritrócito, mas também para as mudanças de forma que a membrana eritrocitária precisa realizar (PARK *et al.*, 2010).

O citoesqueleto do eritrócito está ancorado à bicamada de fosfolípidos através de duas grandes pontes protéicas: uma conecta a banda 3 com a espectrina via anquirina, enquanto a outra envolve uma complexa junção, a qual conecta o carbono terminal da espectrina com um filamento curto da actina (Figura 1). A proteína 4.1, a dematina e a aducina completam o chamado complexo juncional (LALLE *et al.*, 2011).

A espectrina é a mais abundante proteína periférica do citoesqueleto, apresentando peso molecular de 285 kDa. A elasticidade da membrana do eritrócito e sua excepcional resistência a vários mecanismos de agressão dependem das proteínas que compõem seu citoesqueleto. A elasticidade da membrana se deve principalmente às grandes moléculas de espectrina, predominantemente na forma de tetrâmeros, que se ligam com outras proteínas como a actina e a banda 4.1. Deficiências de espectrina, devidas a mutações genéticas, reduzem a estabilidade da membrana, podendo ocasionar fragmentação da célula (BLANC *et al.*, 2010).

A banda 3 catalisa a troca de ânions (primariamente HCO_3^- por Cl^-), fixa o complexo espectrina/actina à bicamada lipídica, organiza e regula as enzimas glicolíticas, participa do controle do tempo de vida do eritrócito e serve de local de contato com outras proteínas periféricas como a proteína 4.1, proteína 4.2 e várias cinases e fosfatases. Tem sido demonstrado que o eritrócito humano possui proteínas de sinalização celular, que são componentes fundamentais para a comunicação das células com o meio extracelular. A banda 3 parece ser o principal alvo para estes processos de sinalização celular (HEBBEL, 1991).

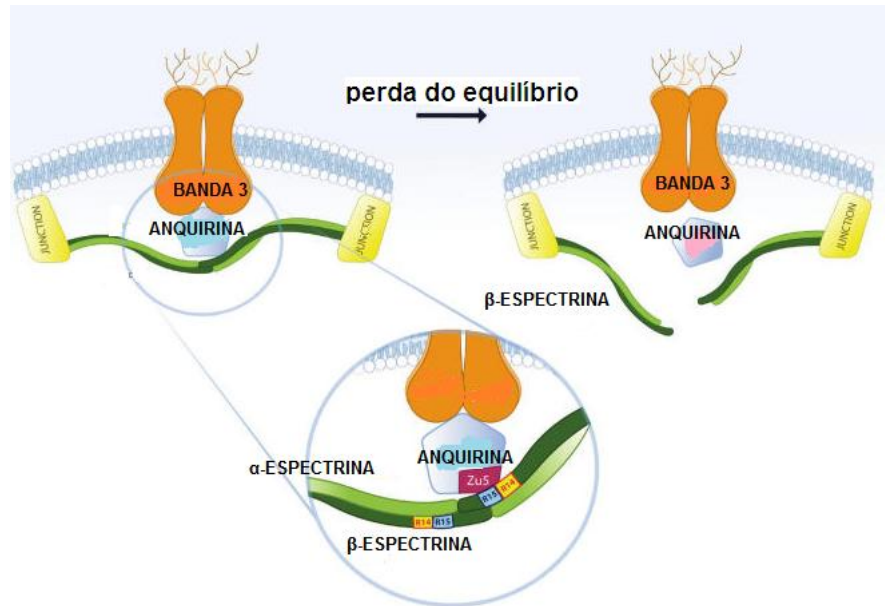


FIGURA 1. ESTRUTURA DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA. DISPOSIÇÃO DAS PROTEÍNAS INTEGRAIS BANDA 3 E ANQUIRINA COM A FRAÇÃO β DA ESPECTRINA. FONTE: (PARK, 2010).

Os lipídeos representam 50 a 60% da massa da membrana eritrocitária, sendo que os fosfolipídeos e o colesterol estão presentes em concentrações aproximadamente iguais. Cinco classes de compostos são responsáveis pela maior parte dos fosfolipídeos, seguintes concentrações: fosfatidilcolina (28%), fosfatidiletanolamina (27%), esfingomiélin (26%), fosfatidilserina (13%) e fosfatidilinositol (HILL *et al.*, 2006). Os fosfolipídeos estão distribuídos assimetricamente entre as duas camadas lipídicas da membrana. Oitenta por cento da fosfatidiletanolamina e da fosfatidilserina encontram-se na monocamada interna citoplasmática, ao passo que os lipídeos que contém colina, a fosfatidilcolina e esfingomiélin, são os principais componentes da monocamada externa (TELEN, 1998).

A estrutura lipídica da membrana é mantida por um sistema de transporte ativo através dos fosfolipídeos da membrana. A *flipase* transporta ativamente os aminofosfolipídeos de fora para dentro, enquanto que a *scramblase*, quando ativada, move qualquer um dos fosfolipídeos em todas as direções (STUART; NAGEL, 2004).

Em geral, a membrana age como uma barreira parcial à penetração de todos os solutos. Substâncias não-polares difundem-se através da membrana numa velocidade proporcional à sua solubilidade em solventes orgânicos. Solutos polares aparentemente cruzam a membrana em sítios especializados. A glicose penetra no

eritrócito por difusão facilitada, mediada por uma proteína transmembrana designada transportador de glicose, fornecendo o substrato energético para a glicólise anaeróbica. Das substâncias polares, a água e a maioria dos ânions, especialmente cloretos e bicarbonatos, difundem-se com relativa liberdade através da membrana. Em contraste, a membrana é apenas discretamente permeável aos principais cátions monovalentes (sódio e potássio) e seu movimento depende muito de um mecanismo de transporte que exige energia. No interior do eritrócito, o potássio é o cátion predominante e o sódio é um elemento relativamente escasso. As concentrações de cátions no interior do eritrócito são de aproximadamente 130 mmoles/l de K^+ e 8 mmoles/l de Na^+ , enquanto que plasma contém aproximadamente 140 mmoles/l de Na^+ e 4 mmoles/l de K^+ (TELEN, 1998).

O estado de equilíbrio dinâmico das concentrações de cátions dentro do eritrócito é o resultado de um equilíbrio entre difusão passiva e transporte ativo. Com relação ao sódio, a direção da difusão é para dentro da célula e a do transporte é para fora da mesma. A principal bomba de cátions representa um processo no qual o sódio no interior da célula é trocado pelo potássio de fora. O transporte ativo de Na^+ e K^+ depende da atividade da proteína de membrana Na-K-ATPase. Os ânions parecem atravessar a membrana por duas principais vias. A primeira representa uma reação de permuta, na qual um ânion interno é trocado por um ânion externo. Esse intercâmbio rápido é mediado pela proteína de intercâmbio aniônico da banda 3. A segunda via aniônica representa uma difusão iônica lenta, sendo responsável pelo ganho ou perda líquida de ânions (TELEN, 1998).

2.2 MEMBRANA DO ERITRÓCITO FALCIFORME

Eritrócitos que contêm hemoglobinas instáveis ou mutantes exibem tendência a liberar vesículas de sua membrana ou sofrer de forma exacerbada a hemólise. No caso dos eritrócitos falciformes, várias hipóteses relacionam a mutação molecular com alterações nas propriedades normais da célula, como na permeabilidade da membrana. Diminuição da flexibilidade, aumento do efluxo de cálcio, assimetria lipídica, alterações no citoesqueleto, mudanças na estrutura de superfície da célula, alteração da afinidade por alguns anticorpos são exemplos de

mudanças estruturais, que podem levar a uma lesão na membrana ou ao processo de polimerização dos eritrócitos de pacientes de anemia falciforme (WAUGH *et al.*, 1986; LIU, 1995).

Quando falcizados, os eritrócitos perdem K^+ e ganham Na^+ , um fenômeno atribuído à falha parcial do bombeamento da Na,K -ATPase. A concentração intracelular de cálcio está aumentada durante a falcização devido, em parte, ao prejuízo do bombeamento de cálcio dependente da ATPase (TELEN, 1998). A homeostase anormal dos cátions implica na formação de células falciformes densas e desidratadas, irreversivelmente falcizadas e com menor tempo de vida. Estas células não retornam ao seu estado normal mesmo quando oxigenadas, por que o dano à membrana, nestes casos, é irreversível (STUART; NAGEL, 2004).

A desidratação *in vivo* dos eritrócitos falciformes parece ser devida a vários mecanismos. Quando desoxigenados, por exemplo, os eritrócitos de pacientes da anemia falciforme apresentam um aumento na permeabilidade de sua membrana, o que afeta a homeostase de vários cátions, como Na^+ , K^+ , Ca^{+2} e Mg^{+2} . O eritrócito perde potássio e água pela ativação do canal de Gardos, canal de efluxo de potássio sensível ao cálcio, e o co-transporte K^+/Cl^- fica aumentado devido à diminuição do pH e inchaço da célula. A combinação destes eventos leva à rápida desidratação, formando células falcizadas de maneira irreversível (STUART; NAGEL, 2004).

O processo de oxidação da hemoglobina envolve a formação de metahemoglobina e de produtos de degradação denominados hemicromos reversíveis e irreversíveis. Estes precipitados tomam a forma de inclusões cocóides, conhecidos como corpos de Heinz, que se ligam à membrana do eritrócito. Este processo está associado a danos na estrutura da membrana. A oxidação da hemoglobina pela fenilhidrazina tem demonstrado um agrupamento da banda 3, juntamente com anquirina e glicoforina na membrana eritrocitária, pela formação dos hemicromos. Outro mecanismo de oxidação da hemoglobina envolve a liberação da hemina ou do ferro dos produtos de degradação da hemoglobina. A liberação da hemina ou ferroprotoporfirina IX livre exerce um efeito desestabilizante sobre a membrana do eritrócito, principalmente na interação entre a espectrina e a banda 4.1-actina (JAROLIM *et al.*, 1990).

No processo de polimerização da hemoglobina S, esta fica instável. O grupamento heme ou o ferro são liberados e depositados sobre a superfície da membrana citoplasmática do eritrócito. Pelas repetidas formações de polímeros de

hemoglobina S, pela desoxigenação, os eritrócitos de pacientes de anemia falciforme, produzem membrana associada a hemina. Vias de detoxificação da hemina, como pelo GSH, são necessárias para evitar a formação de H_2O_2 . A falha neste processo pode causar a oxidação de proteínas e dos lipídeos da membrana, por peroxidação lipídica. No eritrócito falciforme gera-se espontaneamente duas vezes mais ânions superóxido e as concentrações de GSH são mais baixas que em eritrócitos normais, ocorrendo a glutatiolação de várias proteínas, com a espectrina (CHANG; KAKHNIASHVILI; GOODMAN, 2005).

A glutatiolação da espectrina contribui para mudanças importantes em complexos ternários dela com outras proteínas, como a banda 4.1, a anquirina. Além disto, foi demonstrado que a anquirina nos eritrócitos falciformes são alvos menos eficientes para a interação com a espectrina do que a anquirina de eritrócitos normais, podendo existir uma correlação entre estas anormalidades estruturais com a gravidade da doença (CHANG; KAKHNIASHVILI; GOODMAN, 2005).

Moléculas pró-inflamatórias induzem a ativação do canal de Gardos, o que pode explicar a associação entre a inflamação, a vasooclusão e o aumento da hemólise durante processos infecciosos em pacientes de anemia falciforme. O entendimento da homeostase dos íons é importante para a terapia, pois a inibição de alguns dos transpacientes de cátions e ânions pode prevenir a desidratação celular, a formação de células densas, com consequente prevenção da irreversibilidade do fenômeno da falcização (STUART; NAGEL, 2004).

A perda da assimetria normal dos fosfolipídeos da membrana, com o aparecimento da fosfatidilserina na superfície externa do eritrócito, está associada a uma série de consequências fisiopatológicas. A exposição da fosfatidilserina pode exacerbar o processo da anemia pelo aumento do reconhecimento da célula pelos macrófagos, por uma maior atividade apoptótica e pela ativação da coagulação. Na anemia falciforme, as repetidas reações de desoxigenação e reoxigenação da hemoglobina S resultam como já descrito acima, em constantes alterações na estrutura da membrana eritrocitária, com formação de microvesículas e espículas, que podem estar relacionadas à exposição da fosfatidilserina, o que desempenha um importante papel na gravidade da doença.

2.3 METABOLISMO ENERGÉTICO DO ERITRÓCITO

Apesar da ligação, transporte e liberação do oxigênio não necessitarem de grandes quantidades de energia, o eritrócito necessita de alguma fonte de energia para garantir sua sobrevivência durante aproximadamente 120 dias. Esta energia é necessária para manter: (1) o ferro no seu estado bivalente; (2) altos níveis de potássio e baixos níveis de cálcio e sódio no interior da célula; (3) os grupamentos sulfidrila das enzimas eritrocitárias, hemoglobina e membrana na forma reduzida e (4) a forma bicôncava da célula (BEUTLER, 2006b).

O processo de utilização de energia a partir de um substrato, como a glicose, é realizado por um grande número de enzimas. Estas são, em sua maior parte, sintetizadas no eritrócito no seu estágio de maturação, na medula óssea e em menor parte na fase de reticulócito. Existem duas vias principais de produção de energia, a via glicolítica Embden-Meyerhof e a via da hexose monofosfato (também chamada *Shunt* das pentoses). Apesar de conter receptores para a insulina, a entrada de glicose no eritrócito é realizada de forma independente destes receptores (BEUTLER, 2006b).

Na via glicolítica, três produtos importantes são formados: NADH, co-fator para a redução da metehemoglobina; ATP, como fonte de energia; e 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG), um regulador importante para a função da hemoglobina (TELEN; KAUFMAN, 1999). A via glicolítica Embden-Meyerhof cataboliza a glicose anaerobicamente a piruvato ou lactato. Cerca de quatro moles de ADP podem ser fosforilados a ATP durante o metabolismo de cada mol de glicose, através de reações controladas por uma série de enzimas, principalmente pela hexoquinase e a fosfofrutoquinase (BEUTLER, 2006b)(Figura 2).

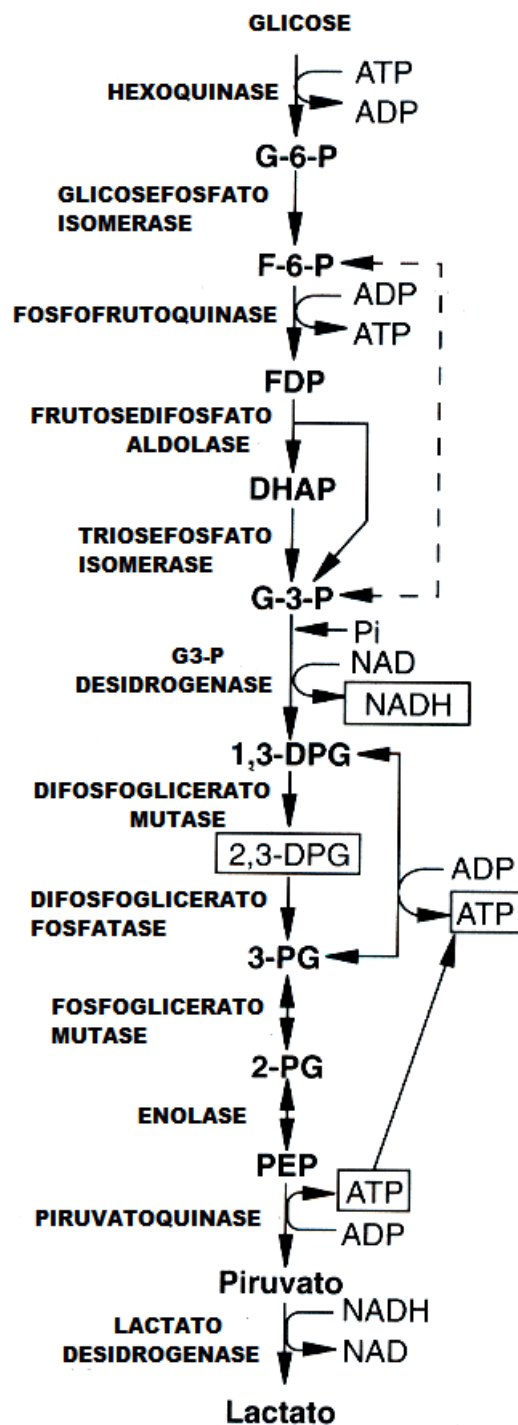


FIGURA 2 – VIA METABÓLICA DE EMBDEN-MEYERHOF.
 FONTE: (VIVES CORRONS, 1994).

A glicólise anaeróbica pode ser dividida em duas etapas: (1) transformação de glicose em gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona-fosfato, com consumo de duas moléculas de ATP e (2) oxidação dos compostos da etapa anterior a piruvato e lactato com formação de quatro moléculas de ATP. Uma derivação importante desta

via é o ciclo de Rapoport-Luebering que transforma o 1,3-bisfosfoglicerato em 2,3-bisfosfoglicerato (2,3BPG). O 2,3 BPG, mediante reação de fosforilação se transforma em 3-fosfoglicerato encerrando o ciclo (VIVES CORRONS, 1994). A concentração de 2,3 BPG depende diretamente da quantidade de 1,3 BPG formada pela reação da bisfosfoglicerato mutase e pela degradação da mesma pela bisfosfoglicerato fosfatase. Íons hidrogênio inibem a reação catalisada pela bisfosfoglicerato mutase e estimulam a bisfosfoglicerato fosfatase. Assim, os níveis de 2,3 BPG são muito sensíveis a alterações de pH (BEUTLER, 2006b) (Figura 2). Os eritrócitos circulantes mantêm altas concentrações de 2,3-BPG, que é importante modulador da afinidade do oxigênio pela molécula da hemoglobina (VIVES CORRONS, 1994). O lactato ou piruvato formados são transportados pelo eritrócito e metabolizados em outros órgãos. A via glicolítica do eritrócito é flexível e a quantidade de ADP fosforilado por mol de glicose depende do requerimento da célula (BEUTLER, 2006b).

A via metabólica da hexose monofosfato, também chamada *Shunt* das pentoses, combina o metabolismo oxidativo da glicose-6-fosfato com a redução dos nucleotídeos da piridina e da glutathiona, promovendo proteção aos eritrócitos contra os oxidantes do meio ambiente. Em eritrócitos humanos maduros, 11% da glicose eritrocitária é consumida por essa via (HILLMAN, 2001), mas nenhum ATP é produzido ou consumido por esta via.

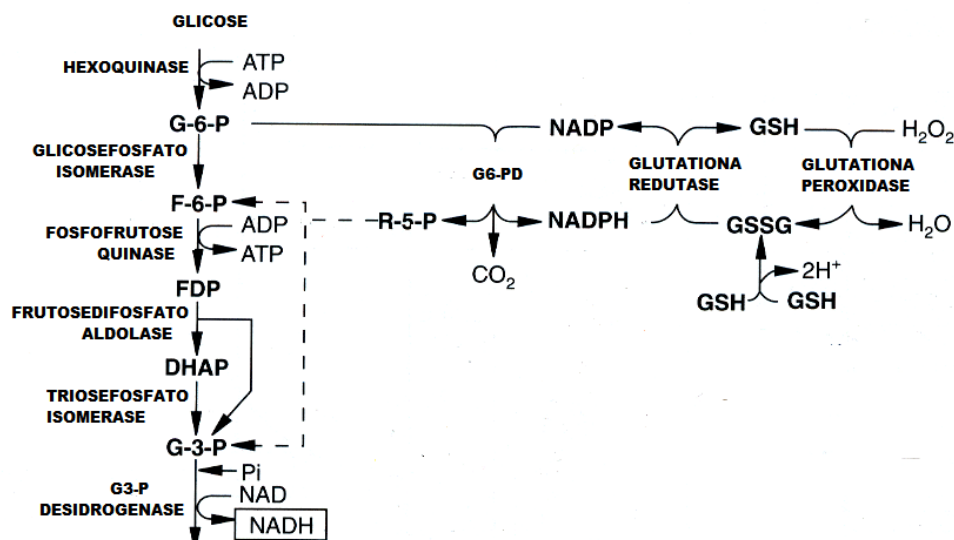


FIGURA 3 – VIA METABÓLICA DA HEXOSE MONOFOSFATO.
FONTE: (VIVES CORRONS, 1994).

Os principais fatores controladores desta via são o coeficiente NADP/NADPH e a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6-PD), que necessita do cofator NADP. Nesta via, a glicose-6-fosfato é oxidada no carbono 1, liberando CO₂, com redução da NADP para NADPH. A quantidade de glicose que passa por esta via é regulada pela quantidade de NADP resultante da oxidação do NADPH, que por sua vez serve como substrato para a conversão da glutathiona oxidada (GSSG) para glutathiona reduzida (GSH)(Figura 3). A GSH é um tripeptídeo com grupo tiol livre presente em organismos aeróbicos e sintetizada na maioria das células. O tripeptídeo é formado pela condensação, ATP dependente, entre ácido glutâmico e cisteína, catalisada pela γ -glutamilcisteinil sintetase; a glicina é adicionada pela glutathiona sintetase. A GSH é abundante no citosol, no núcleo e na mitocôndria das células, sendo o principal antioxidante solúvel nestes compartimentos. A GSSG acumula-se dentro das células e a razão GSH/GSSG é uma boa medida de estresse oxidativo no organismo. As principais ações da GSH contra o estresse oxidativo são: atuar como cofator de várias enzimas, como a GSH-Px, a glutathiona-S-transferase; participar do transporte de aminoácidos através da membrana plasmática; sequestrar radicais OH⁻ e O₂⁻¹; regenerar a maioria dos antioxidantes, como as vitaminas C e E (VALKO *et al.*, 2007).

Várias enzimas são fundamentais para o correto funcionamento da via hexose monofosfato, destacando-se a G6PD e a glutathiona redutase (GR) (Figura 3). A G6PD é uma das enzimas eritrocitárias mais estudadas, e sua principal função é catalisar a oxidação da glicose-6-fosfato a 6-fosfogliconolactona a qual é rapidamente hidrolisada a ácido 6-fosfoglicônico, com a redução de NADP para NADPH durante este processo. A GR tem como função transformar a GSSG em GSH(Figura 4) (BEUTLER, 2006b).

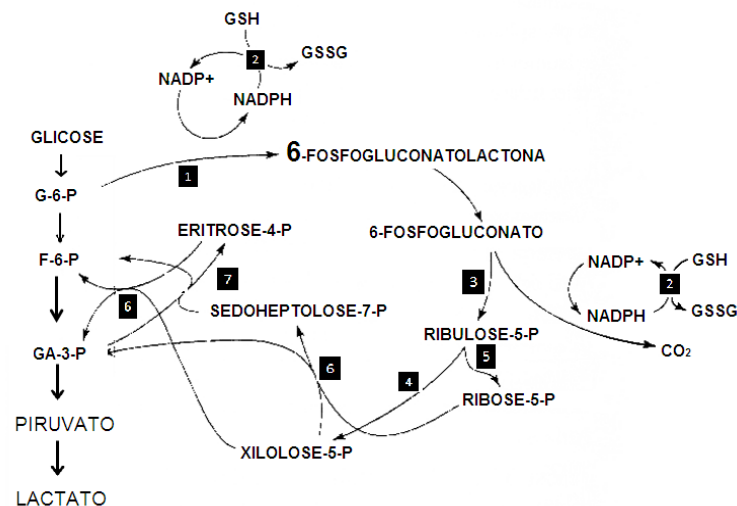


FIGURA 4 – ENZIMAS QUE PARTICIPAM DA VIA HEXOSE MONOFOSFATO: (1) GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE; (2) GLUTATIONA REDUTASE; (3) FOSFOGLUCONATO DESIDROGENASE; (4) RIBULOSEFOSFATO EPIMERASE; (5) RIBOSEFOSFATO ISOMERASE E (7) TRANSALDOSE.
FONTE:(BEUTLER, 2006a)

2.4 REDUÇÃO DA METAHEMOGLOBINA

Nos eritrócitos circulantes, a oxidação da hemoglobina a metahemoglobina ocorre continuamente, através de vias intracelulares e extracelulares, pelas espécies reativas de oxigênio, pelas vias exógena e endógena dos nitritos e pelo óxido nítrico. O acúmulo de metahemoglobina nos eritrócitos reduz sua habilidade de transportar oxigênio, podendo causar a produção constante de ânions superóxido, resultando no aumento do estresse oxidativo para a célula. Em eritrócitos normais, a metahemoglobina é mantida abaixo de 1% da concentração total de hemoglobina por dois sistemas enzimáticos. Um deles é um sistema redutor composto pela citocromo b5 (cytb5) e pela citocromo b5 redutase (cytb5R), as quais transferem elétrons do NADH para a citocromo b5 (Figura 5). Estima-se que mais de 95% da capacidade redutora dos eritrócitos esteja concentrada neste via. A metahemoglobinemia hereditária é uma deficiência congênita da cytb5 ou da cytb5R. A segunda via usa flavina como carreador de elétrons para a redução da metahemoglobina, em uma reação catalisada pela NADPH-flavina redutase (KINOSHITA *et al.*, 2007).

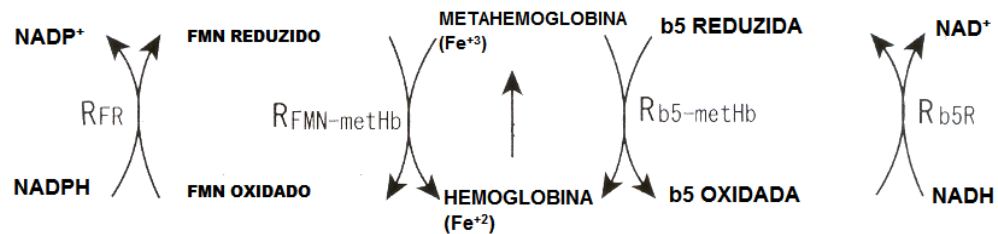


FIGURA 5- VIA DE REDUÇÃO DA METAHEMOGLOBINA. PRINCIPAIS ENZIMAS QUE PARTICIPAM DA VIA: RFR - FLAVINA REDUTASE; RB5 - CITOCROMO B5 REDUTASE - E B5 - CITOCROMO B5.
 FONTE: (KINOSHITA *et al.*, 2007)

2.5 HEMOGLOBINA

A hemoglobina é a proteína respiratória presente no interior dos eritrócitos dos mamíferos e apresenta como principal função o transporte de oxigênio para todo organismo. A sua estrutura consta de uma proteína esferóide, globular, formada por quatro subunidades, compostas de dois pares de cadeias globínicas, polipeptídicas, sendo um par de cadeias do tipo alfa (alfa- α ou zeta- ξ) e outro de cadeias do tipo não alfa (beta- β , delta- δ , gama- γ , épsilon- ϵ) (GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2002). A estrutura quaternária da hemoglobina majoritária do adulto (Hb A) compreende quatro subunidades polipeptídicas, duas cadeias α e duas cadeias β ($\alpha_2\beta_2$). As cadeias α são codificadas no cromossomo 16, e as cadeias β são determinadas pelo braço curto do cromossomo 11. Após a vigésima oitava semana de vida, as concentrações das hemoglobinas chegam às proporções do adulto, de 96 a 98% para a HbA ($\alpha_2\beta_2$), 2,0 a 3,7% de HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) e até 1% para a Hb F ($\alpha_2\gamma_2$)(Figura 6) (STAMATOYANNOPOULOS, 1992).

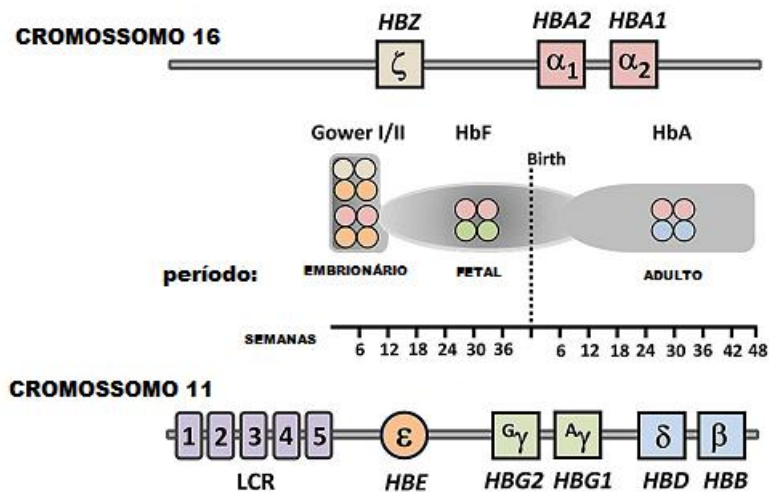


FIGURA 6- ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS GENES ALFA E BETA E A EXPRESSÃO DOS VÁRIOS TIPOS DE HEMOGLOBINA EXPRESSOS DURANTE O PERÍODO FETAL E ADULTO.
FONTE:WILBER (2011).

O complexo do gene beta compreende 6 genes dispostos na seguinte ordem 5' → 3': um gene embrionário simples ϵ , dois genes fetais γ , um pseudogene ($\beta\Psi$) e os genes expressos na vida adulta β e δ (Figura 7). As cadeias produzidas pelos genes γ diferem apenas no aminoácido da posição glicina-136 em $G\gamma$ e alanina em $A\gamma$. Tanto nos agrupamentos β quanto nos agrupamentos α , os genes estão arranjados no cromossomo, na ordem em que são expressos durante o desenvolvimento embrionário, fetal e pós-natal (LEE, 1998).

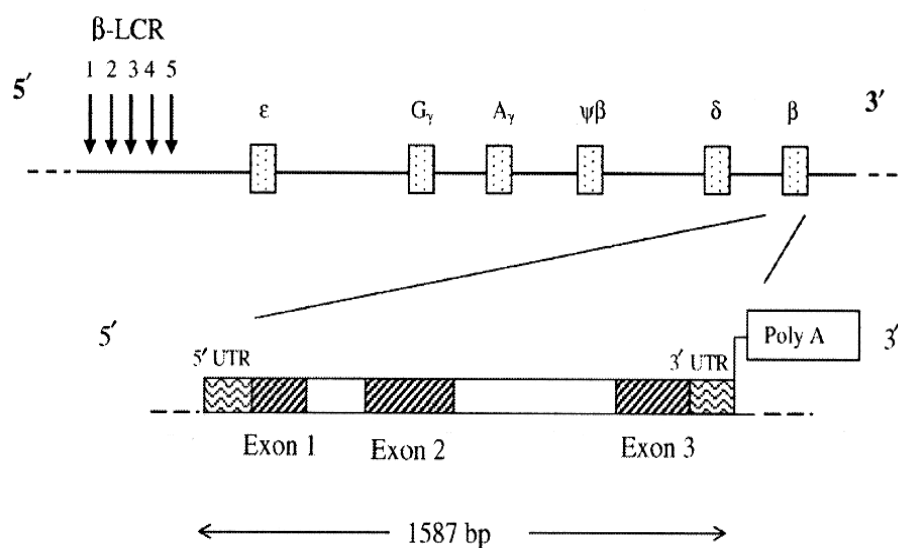


FIGURA 7 – MAPA GENÔMICO DO GENE BETA

FONTE: CLARK, THEIN (2004).

NOTA: O gene beta possui três éxons, dois íntrons e regiões comuns a todos os genes das globinas.

Cada *cluster* do gene da globina já foi completamente sequenciado, com suas estruturas individualmente estabelecidas e um grande número de fatores reguladores definidos. Existem elementos promotores *cis* na região terminal 5' em cada um dos genes, os *boxes* TATA e CCAAT, além de uma região *motifs* duplicada CACCC. Duas sequências reguladoras se destacam: no *cluster* β -globinico, o *locus control region* (LCR), localizado acima do gene embrionário e no “*cluster*” α -globinico, uma região similar ao gene β , chamada de sítio hipersensível HS-40. Estas sequências ao longo do complexo gene globinico contêm sítios de ligação com fatores de transcrição específicos para a série eritróide, como o GATA-1 e o NF-E2 (WEATHERALL; CLEGG, 1999).

A região promotora ou *locus control region* (LCR) está localizada 6 a 20 kb acima do gene embrionário épsilon, e consiste de sítios hipersensitivos, que são específicos para a série eritróide e essenciais para a expressão dos genes da globina. Deleções nesta região levam a um menor transcrição destes genes (WILBER; NIENHUIS; PERSONS, 2011).

A estrutura proteica da hemoglobina é quimicamente unida ao grupo heme. O heme é um complexo ferroso da protoporfirina IX. Entretanto, o termo é também usado no sentido genérico para indicar protoporfirina IX de ferro sem levar em conta o estado de oxidação do ferro. A protoporfirina IX é um tetrapirrol, uma complexa estrutura que compreende quatro anéis pirrólicos unidos, designados pelas letras A,B,C e D. Na periferia do tetrapirrol existem oito sítios onde podem se inserir cadeias laterais (DESSYPRIS, 1998).

2.6 HEMOGLOBINA NA ANEMIA FALCIFORME

A anemia falciforme é uma doença autossômica recessiva caracterizada pelo estado homozigoto para a hemoglobina S (HbS; 6(A1)Glu→Val), na qual a hemoglobina variante resulta de uma mutação no gene β globínico (HBB:c20A→T) (BELISARIO, 2010). A mutação falciforme substitui a adenina pela timina no sexto códon do gene β (GAC→GTG), codificando a valina ao invés do ácido glutâmico na sexta posição do gene. Esta alteração é responsável por profundas mudanças na

estabilidade e solubilidade moleculares da molécula da hemoglobina, como a tendência de polimerização quando a hemoglobina é desoxigenada (ASLAN; FREEMAN, 2007a).

O ácido glutâmico é um aminoácido que tem sua cadeia lateral carregada negativamente com ponto isoelétrico (PI) de 2,77. A valina tem PI de 5,97 e, portanto, é classificada como um aminoácido sem carga, ou neutro. Essa troca de aminoácidos, envolvendo a saída de um com carga negativa e a entrada de outro sem carga, resulta na perda de cargas negativas da hemoglobina S em relação à hemoglobina A, fato que causa a mobilidade eletroforética mais lenta da hemoglobina S (NAOUM, 2000a).

A hemoglobina S no estado de baixa tensão de oxigênio sofre uma modificação na sua conformação molecular devido à presença do aminoácido valina, que interage com o receptor fenilalanina (β -85) e leucina (β -88) na molécula adjacente de hemoglobina S. Esta interação de natureza hidrofóbica desencadeia a formação de polímeros, compostos por fibras de desoxihemoglobina, enoveladas entre si, num processo chamado de nucleação, que progride com o alongamento e alinhamento de mais fibras, criando uma estrutura multipolimérica, na forma de um eixo axial no interior da célula. A partir deste mecanismo, ocorre a transformação da clássica forma bicôncava do eritrócito para nova estrutura celular em forma de foice (GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2002).

A anemia falciforme foi a primeira doença monogênica humana caracterizada em nível molecular (GUALANDRO, 2009), sendo uma das doenças hematológicas herdadas mais comuns em todo o mundo, atingindo grande número de indivíduos nas mais diferentes regiões do mundo. A anemia ou doença falciforme deve ser destacada entre as diversas doenças hemolíticas, devido a sua prevalência e ao elevado grau de morbidade e mortalidade dos pacientes afetados (LEE, 1998).

A molécula de DNA pode sofrer alterações conhecidas como variações genéticas ou polimorfismos, os quais compreendem inserções, deleções e trocas de bases nitrogenadas. Estão descritos para o gene beta mais de 750 polimorfismos, sendo que esta variabilidade genética pode ser identificada pelo uso de enzimas de restrição, que clivam o DNA em pontos específicos, identificando o sítio de cada polimorfismo. O padrão de combinação dos sítios polimórficos para qualquer cromossomo é chamado de haplótipo (ANTONARAKIS; KAZAZIAN; ORKIN, 1985).

Em 1978, Kan e Dozy publicaram a primeira descrição da existência de duas mutações distintas para a hemoglobina S, detectadas pela ação da enzima de restrição Hpa I no sítio de 5 kb a 3' do gene beta, estabelecendo o conceito de origem multicêntrica para esta doença. Estudos subsequentes definiram os principais haplótipos para a anemia falciforme, utilizando enzimas específicas de restrição, o que permitiu melhor compreensão da heterogeneidade clínica da doença, além de terem importância para o seu estudo antropológico (GALIZA NETO *et al.*, 2005).

O gene β^s apresenta cinco tipos principais de haplótipos, nomeados de acordo com a área geográfica de sua maior prevalência (JONES-LECOINTE *et al.*, 2008). Os grupos de haplótipos mais frequentes do *cluster* do gene beta conhecidos são: BEN (BEN); República Centro-Africana ou BAN (CAR); SEN (SEN); Camarões (CAM); Saudita ou Árabe-Indiano (ROMERO, 1998)(Figura 8). Os haplótipos do gene β^s possuem diferentes etnias e origens geográficas: o haplótipo BEN é originado no meio oeste africano; o BAN ou CAR é típico tanto do Centro Sul como do leste africano; o SEN tem origem na África atlântica; enquanto os haplótipos Camarões e o Árabe-Saudita são encontrados na costa oeste da África, e na península arábica e Índia, respectivamente (GONCALVES *et al.*, 2003). A identificação dos polimorfismos do gene β^s possibilita o estudo dos padrões culturais e migratórios dos povos africanos, afro-americanos e asiáticos. Nas Américas, o estudo dos haplótipos β^s tem contribuído para decifrar as intrincadas e complexas viagens que traziam os escravos negros da África para o novo continente entre os séculos 16 e 19 (JONES-LECOINTE *et al.*, 2008). É bem conhecido que o fluxo genético da codificação da HbS para as Américas provém quase que exclusivamente da África, com exceção de uma pequena fração trazida por imigrantes europeus. Como o gene β^s se encontra distribuído ampla e heterogeneamente por todas as regiões americanas, a determinação das frequências dos seus polimorfismos tem levado historiadores e antropólogos a estudar as raízes ancestrais deste gene anormal (ROMERO, 1998).

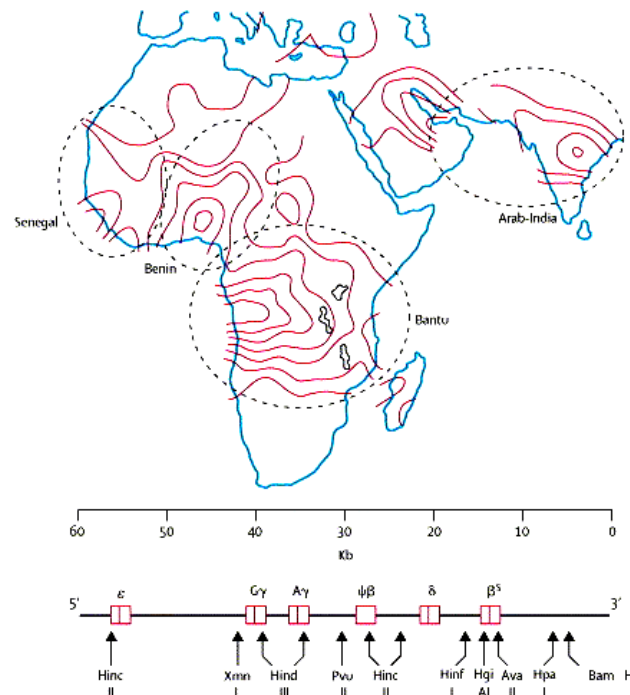


FIGURA 8 – ENZIMAS DE RESTRIÇÃO QUE DETERMINAM OS HAPLÓTIPOS DO GENE BETA.
FONTE: HEBBEL (2005).

Os haplótipos do gene β^S tem papel importante na regulação variável da síntese da hemoglobina fetal, na relação final entre as concentrações de HbS e HbF no adulto e na taxa de redução da HbF durante a infância (NETO; PITOMBEIRA, 2002). Estudos indicam que determinado tipo de haplótipo associado com níveis mais altos de hemoglobina fetal seriam acompanhados de doença com menor gravidade. Por exemplo, a presença do haplótipo SEN, cujos pacientes apresentam concentrações maiores de HbF, estaria relacionado com a menor frequência das crises dolorosas, de infartos ósseos e de insuficiência de órgãos, enquanto o haplótipo CAR, com concentrações mais baixas de HbF, apresentaria manifestações clínicas mais graves (NAOUM, 2000b). Assim, o conhecimento do perfil genotípico da anemia falciforme, sua interação com outras hemoglobinopatias e os níveis de HbF são fundamentais para o entendimento da grande variabilidade das manifestações clínicas da doença.

A hemoglobina fetal é o tipo predominante de hemoglobina no período embrionário, permanecendo em grandes concentrações até o nascimento. Tanto a hemoglobina fetal ($\alpha_2\gamma_2$) quanto a hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$) contém cadeias alfa e, portanto, a alteração na produção destas hemoglobinas se dá pela troca na expressão do gene gama pelo gene beta. Após 6 meses do nascimento, a

hemoglobina A torna-se a hemoglobina mais abundante, sendo que mutações que afetem a expressão do gene beta tornam-se clinicamente evidentes (THEIN *et al.*, 2009). A hemoglobina fetal é atualmente considerada o mais potente modificador da anemia falciforme e tem sido o modulador genético mais estudado na doença. Enquanto a persistência da produção de hemoglobina fetal não tem consequências clínicas em indivíduos saudáveis, esta característica pode conferir grandes benefícios clínicos a pacientes com doença falciforme e β -talassemias. A identificação dos mecanismos de modulação da hemoglobina fetal envolve, não somente a identificação das variantes causais e dos genes cuja expressão elas alteram, mas também as consequências funcionais subsequentes (GUALANDRO, 2009).

A evidência bioquímica de que a hemoglobina fetal é um potente inibidor da polimerização da deoxihemoglobina S é bem conhecida e confirmada em diversos estudos, havendo relação inversa entre a concentração de hemoglobina fetal e as crises características da doença falciforme (EPSTEIN, 1997).

Neste contexto, os haplótipos da anemia falciforme parecem estar intimamente ligados com a maior ou menor expressão da hemoglobina fetal. Uma das hipóteses estudadas é a relação dos haplótipos com a expressão das cadeias $G\gamma$ e $A\gamma$, o que influencia diretamente a quantidade de hemoglobina fetal a ser produzida. Em recém-nascidos, a quantidade de cadeias $G\gamma$ é maior que as cadeias $A\gamma$, em uma razão aproximada de 6:4, porém no período adulto, esta relação inverte-se para 4:6, o que torna a quantidade de hemoglobina fetal muito pequena nesta fase em indivíduos normais. Porém, em alguns haplótipos da anemia falciforme, mantém-se a relação de cadeias $G\gamma$ e $A\gamma$ próxima à do período neonatal, mantendo-se desta forma, concentrações maiores de hemoglobina fetal, mesmo no período adulto (ROMERO, 1998).

Demonstrou-se que a mutação C→T na posição -158 na extremidade 5' do gene $G\gamma$ pode estar associada com um aumento da relação $G\gamma:A\gamma$. Esta mutação pode ser detectada por uma enzima de restrição específica (XmnI) e seria um dos marcadores para o polimorfismo encontrado em pacientes homozigotos para a hemoglobina S, oriundos da península arábica e de algumas tribos da Índia. Nestes pacientes, onde a concentração de hemoglobina fetal é maior, a doença desenvolve-se com menor gravidade clínica (KULOZIK, 1987).

Os haplótipos SEN e árabe-indiano estão associados com altas concentrações de hemoglobina fetal, com conservação da razão $G_\gamma:A_\gamma$ do período neonatal, podendo chegar a 20%. Nestes haplótipos, as mutações observadas são muito semelhantes, diferenciando-se em poucos sítios de restrição com presença comum da mutação $C \rightarrow T$ na região promotora do gene G_γ . O haplótipo CAR, ao contrário, apresenta relação $G_\gamma:A_\gamma$ muito baixa, com concentrações de HbF abaixo de 5%. Outros polimorfismos, como o BEN e CAM, apresentam concentrações intermediárias de HbF (5 a 15%), com uma razão $G_\gamma:A_\gamma$ de 1:1 (ROMERO, 1998).

Este quadro encoraja ao estudo molecular da síntese da hemoglobina fetal, bem como terapias que tenham como consequência o seu aumento. O maior exemplo disto é a descoberta de que a hidroxiureia, que é utilizada nos tratamentos da anemia falciforme por aumentar a quantidade de hemoglobina fetal, diminui o grau de hemólise e as crises vasooclusivas. Desta forma, torna-se relevante avaliar a concentração de hemoglobina fetal, separadamente, em amostras de sangue de diversos haplótipos, correlacionando-os com a gravidade da doença.

2.7 DESNATURAÇÃO OXIDATIVA DA HEMOGLOBINA

A hemoglobina é fonte abundante na geração de ânions superóxido nos diversos sistemas biológicos. Existe uma transferência de elétrons entre o ferro do grupamento heme e o oxigênio quando a hemoglobina está no seu estado oxigenado. Quando a hemoglobina sofre a desoxigenação, ocorre a formação de metahemoglobina e ânions superóxido. A taxa fisiológica de formação de metahemoglobina providencia contínua formação de superóxidos que, por sua vez, produzem peróxido de hidrogênio e oxigênio como produtos de dismutação (ASLAN; THORNLEY-BROWN; FREEMAN, 2000). A ligação do oxigênio na Hb envolve uma substancial migração de carga do ferro do grupo heme, formando um ânion O_2^- como sexta ligação coordenada, e um íon ferroso de baixo *spin*. Na desoxigenação da Hb, o elétron compartilhado normalmente retorna ao ferro quando o oxigênio é liberado. O grupo heme está protegido da autooxidação por uma região hidrofóbica, mas quando esta região é perturbada, uma ligeira modificação estrutural pode permitir a entrada de pequenos ânions ou água, e o grupo heme perde um elétron,

oxidando-se a seu estado de maior *spin*, a metahemoglobina, com liberação do radical O_2^- (HARRIS, 1991). A taxa de oxidação é intensificada por condições como: aumento de temperatura, diminuição do pH, presença de fosfato e de íons metálicos e oxigenação parcial da hemoglobina. Para ligar reversivelmente o oxigênio, entretanto, o ferro da porção heme deve ser mantido no estado reduzido, apesar da exposição a uma variedade de agentes oxidantes endógenos e exógenos. O eritrócito mantém várias vias metabólicas para impedir a ação desses agentes oxidantes e para reduzir o ferro da hemoglobina. Sob determinadas condições, esses mecanismos podem falhar e a hemoglobina deixa de ser funcional (TELEN, 1998).

A degradação da Hb é escalonada. À medida que a desnaturação continua, a metahemoglobina converte-se em hemicromos. Estes aparecem quando a sexta posição de coordenação do ferro se une de maneira covalente com um ligante na molécula de Hb (histidina distal E7), distorcendo a estrutura terciária da molécula. Os hemicromos podem ser reversíveis ou irreversíveis, dependendo do grau de distorção da célula e da capacidade da enzima metahemoglobina redutase em reduzi-los. Quando os fenômenos oxidativos promovem a quebra da ligação entre as cadeias α e β , as cadeias polipeptídicas se dissociam em dímeros e monômeros, que precipitam como inclusões intraeritrocitárias denominadas corpos de Heinz, que se unem à membrana e diminuem o tempo de vida do eritrócito (PEÑUELA, 2005).

2.8 DESNATURAÇÃO OXIDATIVA DA HEMOGLOBINA FALCIFORME

A substituição de aminoácidos que ocorre na hemoglobina S (HbS) causa mínimas mudanças estruturais em relação à hemoglobina A, quando estas estão ligadas ao oxigênio. Porém, quando desoxigenadas, o resíduo mutante da desoxi-HbS participa de contatos intermoleculares com outras moléculas de hemoglobina, com consequente formação de polímeros, que podem ser reversíveis ou irreversíveis (EPSTEIN, 1997; ASLAN; FREEMAN, 2007a). O processo de desoxigenação da HbS favorece a metahemoglobinização, aumentando assim a sua concentração e superando a ação da enzima metahemoglobina redutase, fato que causa a formação de hemicromos e precipitação de globina S sob a forma de corpos de Heinz,

promovendo o desalinhamento da proteína banda 3 da membrana do eritrócito. Os eritrócitos falcizados e com alterações na estrutura da membrana sofrem alterações na distribuição das moléculas de imunoglobulinas em suas superfícies, cujas concentrações elevadas em determinadas regiões dos eritrócitos facilitam as ligações com receptores Fc das células endoteliais e, dessa forma, induzem a ação fagocitária dos macrófagos no sistema retículo endotelial, causando hemólise e anemia (NAOUM, 2000b).

Em suspensões de hemoglobina de pacientes de anemia falciforme (HbS), a autooxidação da hemoglobina oxigenada é 1,7 vezes mais rápida do que na hemoglobina de indivíduos normais. Comparando-se eritrócitos falciformes com eritrócitos normais, aqueles podem gerar o dobro de ânions superóxidos, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxil, bem como produtos de oxidação lipídica (ASLAN; THORNLEY-BROWN; FREEMAN, 2000).

2.9 POLIMERIZAÇÃO DA HEMOGLOBINA S E SUA RELAÇÃO COM A HOMEOSTASE DO FERRO NA ANEMIA FALCIFORME

Quando a hemoglobina S é desoxigenada, a substituição do ácido glutâmico pela valina resulta em interações hidrofóbicas com outras moléculas de hemoglobina, levando à formação de agregados de hemoglobina na forma de polímeros, resultando na distorção da forma e na perda da deformabilidade do eritrócito falciforme. Estas células rígidas são responsáveis pelos episódios vasooclusivos que caracterizam a doença. A taxa e a extensão da formação destes polímeros dependem principalmente de três variáveis independentes: o grau de desoxigenação, a concentração de hemoglobina intracelular e a presença ou não de hemoglobina fetal (EPSTEIN, 1997). A polimerização da hemoglobina S (HbS) é o evento primário da fisiopatologia da anemia falciforme, que ocorre em baixas tensões de oxigênio (HEBBEL *et al.*, 1988; UZUNOVA *et al.*, 2010) (Figura 9). O processo tem sido descrito como um mecanismo de dupla nucleação, iniciando com um núcleo simples de fibras, seguido do crescimento e ramificação de novas fibras sobre as fitas já existentes. Por muito tempo, a polimerização da HbS foi considerada como o evento que explicaria todas as características clínicas da

anemia falciforme, porém várias discrepâncias tem sido observadas, o que desperta o interesse para outros possíveis fatores fisiopatológicos. Por exemplo, eritrócitos com alta concentração de HbS, nos quais a polimerização deveria ser mais rápida, não estão necessariamente correlacionados com o aumento da incidência de episódios dolorosos em pacientes com anemia falciforme. Além disto, alguns estudos demonstram que as manifestações clínicas são extremamente diferentes entre pacientes que possuem a mesma concentração de HbS (UZUNOVA *et al.*, 2010).

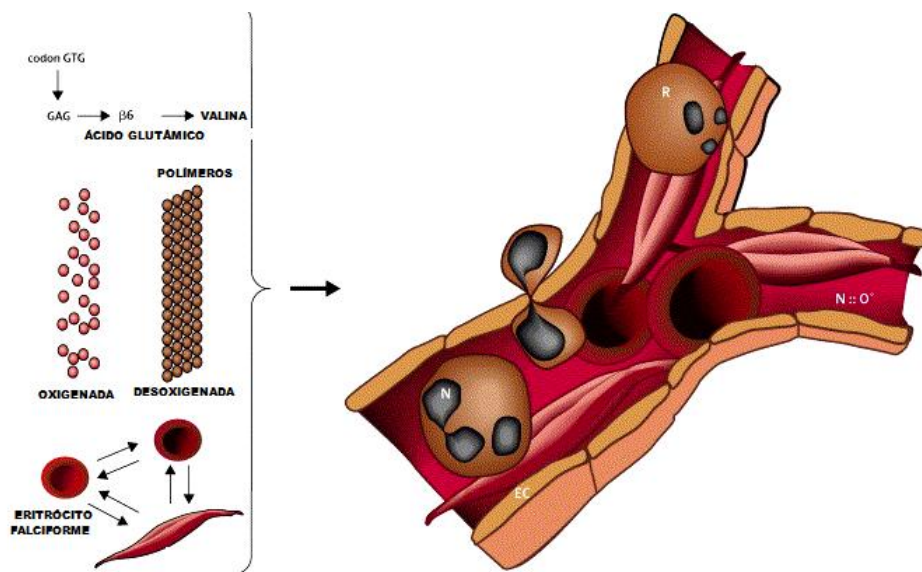


FIGURA 9 – FISIOPATOLOGIA DA VASOOCLUSÃO.
FONTE: (STUART; NAGEL, 2004).

A anemia falciforme é reconhecidamente uma doença caracterizada por autooxidação e pelo descompartilhamento do ferro. Dentro deste contexto, dois componentes celulares desempenham importante papel na fisiopatologia da doença: a formação espontânea de superóxido e a quantidade anormal de hemicromos ligados à membrana do eritrócito falciforme (HEBBEL *et al.*, 1988). O dano oxidativo causa a desnaturação irreversível da hemoglobina, aumentando a tendência a fenômenos adicionais de autooxidação. A agregação dos precipitados de hemoglobina à membrana eritrocitária leva a um descompartilhamento do ferro que pode levar a várias mudanças na estrutura e na função da membrana (ASLAN; THORNLEY-BROWN; FREEMAN, 2000). A face citosólica da membrana do eritrócito falciforme carrega 4 compartimentos anormais de ferro: dois tipos de heme

ligado ao ferro, constituindo o heme livre ou hemina e os hemicromos; e dois tipos de ferro não ligado ao grupamento heme, a ferritina e o ferro molecular (BROWNE; SHALEV; HEBBEL, 1998).

O depósito anormal de hemicromos associa-se às proteínas periféricas e do citoesqueleto da membrana eritrocitária, principalmente à banda 3. Em termos quantitativos, as membranas dos eritrócitos falciformes contêm maior quantidade de hemicromos e heme livre quando comparadas às dos eritrócitos normais (BROWNE; SHALEV; HEBBEL, 1998).

A presença do heme livre pode afetar a taxa de polimerização, constituindo-se em mais um fator a ser analisado na fisiopatologia da anemia falciforme. O heme pode ser liberado do eritrócito falciforme após a autooxidação da hemoglobina a metahemoglobina, observando-se uma concentração 4 a 5 vezes maior em suspensões de membranas eritrocitárias de células falciformes em relação às de eritrócitos normais. A presença do heme livre no eritrócito implica em maior dano à membrana, aumentando a adesão da célula ao endotélio. A gravidade da doença em pacientes com semelhantes quantidades de HbS, pode ser relacionada com o aumento da liberação do heme, na forma de ferro ligado à membrana. A remoção do heme livre previne, enquanto a sua adição promove, a polimerização da HbS, o que pode ser explicado pela maior atração intermolecular que existe entre as moléculas de hemoglobina S, aumentando a nucleação e, conseqüentemente, a polimerização (UZUNOVA *et al.*, 2010).

2.10 ESTRESSE OXIDATIVO

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo humano, sendo observada em diversas condições fisiológicas. ERO e ERN têm importância biológica, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor. Por outro lado, quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes, e com dano

consequente (VASCONCELOS, 2007). O sistema antioxidante enzimático que protege organismos aeróbios do dano dos radicais livres inclui a superóxido dismutase citoplasmática, mitocondrial e extracelular (SOD), a glutathione peroxidase (GPx) e a catalase (ASLAN; THORNLEY-BROWN; FREEMAN, 2000). O sistema antioxidante não enzimático é formado por muitas substâncias, com destaque para a glutathione (GSH), principal composto antioxidante intracelular, tocoferóis, ascorbato, ácido úrico e β -caroteno, além de proteínas de transporte como a transferrina e a ceruplasmina (VASCONCELOS, 2007). O Quadro 1 apresenta as principais espécies reativas de oxigênio.

QUADRO 1 – CARACTERÍSTICAS DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO).

Espécies Reativas de Oxigênio	
Espécie Radicalar	Características (Natureza, geração e destino)
Anion radicalar superóxido $O_2^{\cdot-}$	Gerado continuamente por diversos processos celulares ou pela redução monoeletrônica de O_2 . Desaparece rapidamente em solução aquosa por reação de dismutação. Em fagócitos, é um dos microbicidas mais importantes.
Peróxido de hidrogênio H_2O_2	Intermediário formado pela reação de dismutação do ânion superóxido catalisada pela enzima SOD. É muito difusível dentro e entre as células <i>in vivo</i> . É fraco agente oxidante e redutor. Em presença de metais de transição gera radicais hidroxil pela reação de Fenton.
Radical hidroxila $\cdot OH$	É o mais reativo e letal dos radicais. Causa modificação no DNA, danos a proteínas e peroxidação lipídica.
Radicais peroxila (RO_2^{\cdot}) e alcóxila (RO^{\cdot})	Formados durante a decomposição de peróxidos orgânicos e reações de carbono radicalar com o oxigênio, como na peroxidação lipídica.
Oxigênio “singlete”	Estado eletronicamente excitado do oxigênio, produzido por reações fotoquímicas e por radiações.
Ozonio O_3	Produzido no ar atmosférico poluído e por fonte de luz intensa de algumas fotocopiadoras e outros equipamentos. É extremamente danoso ao pulmão, oxidando proteínas, DNA e lipídeos.

FONTE: ADAPTADO (VASCONCELOS, 2007).

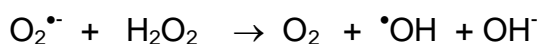
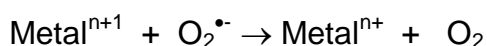
As ERO podem ser geradas de maneira endógena ou exógena. A cadeia respiratória mitocondrial, a via metabólica citocromo P450 e as respostas inflamatórias são importantes fontes de ERO endógenas. O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), uma forma simples de ERO, é produzido pela adição de um elétron ao oxigênio molecular no interior da mitocôndria. A mitocôndria produz aproximadamente 2 a 3 nmoles de superóxido/min/mg de proteína. Este radical pode formar peróxido de hidrogênio, bem como outros radicais, como hidroxil ($\cdot OH$) e peroxil (ROO^{\cdot}). A xantina oxidase (XO) é também importante fonte de ERO de forma endógena. Por outro lado, reagentes químicos, xenobióticos, íons metálicos e radiações são fontes

exógenas de ERO. Enquanto as fontes endógenas são relacionadas com a manutenção do metabolismo normal, como funções imunes, as fontes exógenas são mais relacionadas com propriedades tóxicas e até carcinogênicas (SHI, 2012).

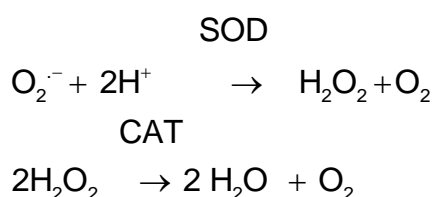
Íons metálicos produzem ERO de maneiras direta ou indireta, nas quais a reação de Fenton é a forma mais conhecida e estudada. Durante esta reação, os íons dos metais de transição reagem com peróxido de hidrogênio para gerar radicais $\cdot\text{OH}$, altamente tóxicos e um íon metálico oxidado:



Enquanto a eficiência do cobalto e do níquel em gerar radicais hidroxil é muito baixa, em virtude de seu alto potencial redox, o Fe^{+2} produz radicais tóxicos mais facilmente. Outro mecanismo importante de formação de ERO a partir de íons metálicos é pela reação de Haber-Weiss, onde o ânion superóxido participa tanto da geração de $\cdot\text{OH}$ a partir do peróxido de hidrogênio como também da redução do Fe^{+3} , levando à Reação de Fenton:



O mecanismo de geração de radicais $\cdot\text{OH}$ pela reação de Haber-Weiss parece ser a maneira predominante de formação destes radicais *in vivo*. As ERO são constantemente geradas em pequenas quantidades durante o metabolismo aeróbico normal. A maior produção de ERO é primariamente suprimida por antioxidantes endógenos, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutational peroxidase (GPx) e por antioxidantes secundários exógenos, como algumas vitaminas e compostos polifenólicos. Como a mitocôndria é grande fonte de ERO, é rica em GSH e enzimas antioxidantes em sua matriz e nos espaços intermembrana. O ânion superóxido formado na mitocôndria é detoxificado a H_2O_2 pela SOD e posteriormente a H_2O , pela CAT (SHI, 2012):



O termo Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) inclui os radicais óxido nítrico (NO^\bullet), peroxinitrilo (ONOO^-), o radical dióxido de nitrogênio (NO_2^\bullet) e outros óxidos de nitrogênio e produtos da reação do óxido nítrico com ânion superóxido e radicais peroxilas (Quadro 2) (WISEMAN; HALLIWELL, 1996). A maioria das ERN são derivadas do NO^\bullet , com destaque para o peroxinitrilo, que possui várias atividades biológicas. O ONOO^- é formado pela reação entre o NO^\bullet e o ânion O_2^{-1} . O óxido nítrico é um mensageiro intracelular, produzido na maioria das células, incluindo o endotélio vascular, células musculares lisas, neurônios, macrófagos, neutrófilos, plaquetas e epitélio. Uma vez formado pela NO sintetase endotelial (NOS), o óxido nítrico difunde-se pelas células musculares lisas, onde reage com o ferro, no seu estado reduzido, produzindo monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). O GMPc então ativa a proteína quinase G (PKG), a qual estimula a Ca^{+2} -ATPase, diminuindo a concentração de cálcio intracelular, o que resulta em relaxamento da musculatura lisa. Este mecanismo de sinalização também é um potente inibidor da agregação plaquetária. Além destas propriedades, o óxido nítrico é um potente antagonista da inflamação pela inibição da ativação do Fator Nuclear-Kappa B ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) (ASLAN; FREEMAN, 2007a).

QUADRO 2 – CARACTERÍSTICAS DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO (ERN) E CLORO.

	Espécies derivadas do nitrogênio e do cloro
Espécie Radicalar	Características (Natureza, geração e destino)
Ácido Hipocloroso	Espécie não radicalar, oxida grande número de compostos biológicos, como tióis, aminas, fenóis. Oxida ferro e proteínas.
HOCl	Produzido por fagócitos ativados, reage com o ânion superóxido para formar $^\bullet\text{OH}$.
Óxido nítrico	Sintetizado pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS).
NO^\bullet	Participa de vários processos biológicos, como relaxamento muscular e regulação imune. Potente vasodilatador, envolvido na regulação da pressão arterial.
Dióxido de nitrogênio	Formado a partir da exposição de NO^\bullet .
NO_2^\bullet	Potente iniciador da peroxidação lipídica
Peroxinitrito	Instável, oxidante potente.
ONOO^-	Propriedades semelhantes ao radical OH^\bullet .

FONTE: ADAPTADO (VASCONCELOS, 2007).

2.11 ESTRESSE OXIDATIVO E ANEMIA FALCIFORME

O estado homozigoto da anemia falciforme resulta em uma série de alterações na função e morfologia do eritrócito, que diminuem sua sobrevivência e levam à oclusão vascular pela rigidez aumentada do eritrócito falciforme, com consequente dano a diversos órgãos. Caracteriza-se por um quadro de anemia hemolítica crônica que está associada com o desenvolvimento de doenças vasculares, hipertensão pulmonar e ulceração cutânea (TAYLOR *et al.*, 2008). Todos os indivíduos que são homozigotos ou compõem um estado heterozigoto para a presença da hemoglobina S apresentam alguma manifestação clínica da doença. Os sintomas usualmente aparecem nos primeiros seis meses de vida, porém a doença apresenta considerável variabilidade quanto a sua gravidade.

O genótipo é o fator mais importante para a determinação da gravidade da doença. Indivíduos com genótipo SS (anemia falciforme) apresentam maior gravidade de sintomas quando comparados com indivíduos HbS/ β^0 talassemia. Por outro lado, pacientes com a associação SC e HbS/ β^+ talassemia tendem a apresentar complicações mais brandas ou benignas da doença. Com relação à expectativa de vida, os pacientes SS apresentam, em média, vinte anos a menos de vida em relação a pacientes SC (ASCHLEY-KOCH, 2000).

Na anemia falciforme há alterações do eritrócito que se caracterizam por processos de falcização e hemólise, bem como modificações funcionais nas plaquetas, nos leucócitos e em células endoteliais. Um achado clínico comum na doença, a síndrome torácica é resultado de um processo vaso-oclusivo no qual a isquemia ou a reperfusão envolvidos são resultados de uma interação anormal entre o endotélio vascular e eritrócitos, leucócitos e plaquetas. O estresse oxidativo é postulado como uma das causas destas anormalidades funcionais, sendo definido como um desequilíbrio entre a geração de ERO e a sua principal enzima sequestradora, a glutatona reduzida (GSH) (AMER, 2005).

As ERO desempenham papel fundamental na fisiopatologia de diversas doenças isquêmicas. O conceito de que a anemia falciforme apresenta um estado inflamatório é baseado na ativação e excessiva geração de ERO e no aumento das interações entre os leucócitos e o endotélio, o que gera os fenômenos vasooclusivos característicos da doença (DASGUPTA, 2006). Outro aspecto importante

relacionado ao estresse oxidativo na anemia falciforme é a diminuição da atividade do óxido nítrico, provavelmente devido ao seu consumo por radicais livres oxigenados, ou pelo grupamento heme plasmático livre resultante do processo hemolítico (ASLAN; CANATAN, 2007).

Na anemia falciforme, o eritrócito apresenta aumento da ligação da hemoglobina com a membrana, diminuição da sua deformabilidade, elevação do cálcio intracelular, desidratação celular, fluidez lipídica diminuída, defeito no citoesqueleto, entre outras alterações que diminuem sensivelmente sua sobrevivência, levando a um quadro de anemia hemolítica crônica (RICE-EVANS; OMORPHOS; BAYSAL, 1986; FORMICA; REGELSON, 1995).

Eritrócitos falciformes, além da formação de cristais tactóides de hemoglobina S, apresentam várias alterações, tanto na sua estrutura de membrana quanto nas concentrações de enzimas antioxidantes, como a glutathione peroxidase e a catalase. Diversos estudos indicam que os eritrócitos falciformes geram o dobro de radicais superóxido, peróxido e hidroxil quando do efeito de incubação (RICE-EVANS; OMORPHOS; BAYSAL, 1986). As manifestações clínicas da doença falciforme são devidas ao processo hemolítico, levando a grave anemia e vasoocclusão. Na fisiopatologia desta anemia, a suscetibilidade aumentada ao estresse oxidativo é o fator mais relevante e importante para as características clínicas da doença (TAKASU *et al.*, 2006).

Outras características confirmam a tendência dos eritrócitos falciformes a sofrerem estresse oxidativo. A geração de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil pela HbS é aproximadamente duas vezes maior quando comparada a HbA (HEBBEL *et al.*, 1988; HEBBEL, 1991). Além disso, a membrana eritrocitária na anemia falciforme manifesta atividade da reação de Fenton aumentada, pela maior quantidade de ferro livre ou associado à membrana, o que aumenta a reatividade com radicais O_2^- e H_2O_2 (SHENG; SHARIFF; HEBBEL, 1998).

Um aspecto central da vasculopatia que caracteriza a anemia falciforme está relacionado à deficiência na regulação endotelial do tônus vasomotor, da formação de trombo e dos processos inflamatórios. A redução da biodisponibilidade do óxido nítrico é um componente crítico para o entendimento destas anormalidades, sendo relacionada com o consumo do NO^* no plasma pela hemoglobina livre e pelas ERO (ASLAN; FREEMAN, 2007b). Tem sido sugerido que pacientes com anemia falciforme tem uma diminuição nas reservas de NO^* . Os níveis plasmáticos de L-

arginina, um precursor para o NO^* , são menores em pacientes de anemia falciforme, principalmente durante as crises vasooclusivas e na síndrome torácica, tendo relação inversamente proporcional às crises dolorosas. Estes dados sugerem a relação entre a disfunção endotelial e a redução da biodisponibilidade do NO^* (MACK; KATO, 2006).

O NO^* é produzido por isoformas de óxido nítrico (NO) sintetase, usando como substrato a L-arginina. A hemólise intravascular libera hemoglobina, arginase e Lactato desidrogenase (LDH) dos eritrócitos para o plasma. A hemoglobina plasmática liberada pela hemólise ou *cell-free plasma hemoglobin* inativa o NO^* , gerando metahemoglobina e nitrato (Figura 10).

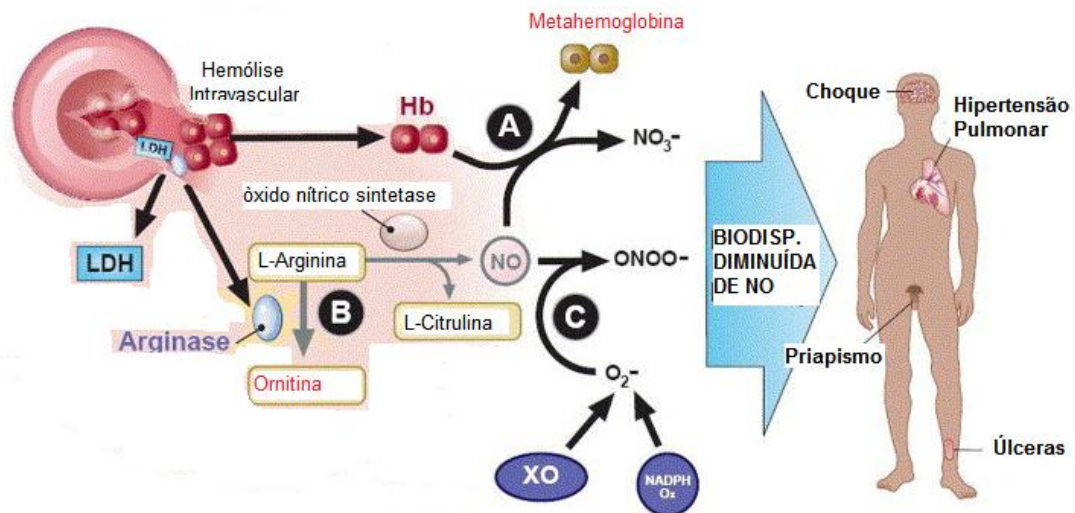


FIGURA 10 – REDUÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DO ÓXIDO NÍTRICO PELA HEMÓLISE INTRAVASCULAR.

NOTA: (A). Arginase no plasma transforma L-arginina em ornitina, diminuindo a biodisponibilidade do NO^* ; (B). LDH é marcador da liberação de hemoglobina e arginase. O NO^* é consumido pelas ERO produzidas pelos altos níveis da xantina oxidase e da NADPH oxidase, situação comum na anemia falciforme; (C). diminuição da biodisponibilidade do NO^* .

FONTE: MACK:KATO(2006)

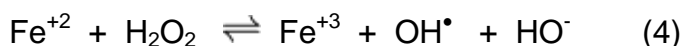
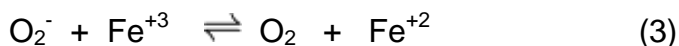
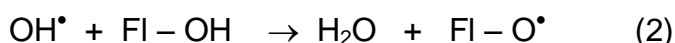
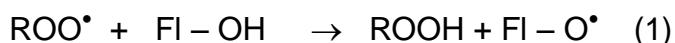
O fluxo laminar sanguíneo e a compartimentalização da hemoglobina no interior do eritrócito cria uma barreira natural contra o consumo do NO^* . Por outro lado, hemoglobina livre no plasma resultante de hemólise intravascular consome 1000 vezes mais NO^* , limitando a biodisponibilidade do mesmo. Assim, hemólise intravascular produz um estado de resistência à vasodilatação dependente do NO^* . O sequestro de NO^* pelas ERO providencia um mecanismo adicional à diminuição

da biodisponibilidade do óxido nítrico. Neste contexto, pacientes que sofrem de hemólise intravascular, como na anemia falciforme, aumentam o risco de várias complicações (MACK; KATO, 2006).

2.12 FLAVONOIDES COMO TERAPIA ANTIOXIDANTE

Os flavonoides são compostos polifenólicos encontrados em vegetais, na composição de frutas, ervas, chás e vinhos, como metabólitos secundários. Estes compostos podem apresentar-se na forma livre, como agliconas, ou ligados a um açúcar, como glicosídeos, e podem ser utilizados terapeuticamente, como agentes antioxidantes, por reduzirem os danos causados pelos radicais livres (BARRECA *et al.*, 2009). Por sua reconhecida atividade antioxidante e por atuarem como quelantes de alguns metais, os flavonoides têm sido estudados como opção terapêutica para doenças que tenham o envolvimento de radicais livres (AFANAS'EV *et al.*, 1989). Em muitos estudos, tem-se demonstrado que dietas ricas em flavonoides estão associadas a baixo risco de doenças cardiovasculares, além do efeito benéfico destes compostos em processos inflamatórios e alérgicos, na redução da agregação plaquetária e na melhora da função endotelial (BARRECA *et al.*, 2009).

Como compostos fenólicos, os flavonoides podem sequestrar radicais hidroxil e peroxil (reações 1 e 2), além de agirem como quelante de metais, diminuindo a formação de radicais hidroxila pela reação de Fenton (reações 3 e 4):



Os radicais livres são moléculas que possuem elétrons desemparelhados o que explica a sua tendência de capturar estes elementos de outras substâncias para a sua estabilidade. Consequentemente, neste processo, outros radicais são liberados, os quais iniciam uma reação em cadeia, resultando em centenas de radicais livres poucos segundos após o início da reação. Os radicais livres e as ERO

causam dano ao DNA, produzindo purinas e pirimidinas oxidadas, o que tem sido correlacionado com várias condições patológicas, como o câncer e doenças cardiovasculares. Deste modo, fica evidente a importância dos antioxidantes como inibidores destes processos, o que justifica a necessidade do estudo do comportamento destas substâncias (KALPANA; SRINIVASAN; MENON, 2009).

A família dos flavonoides compreende membros das classes das flavonas, isoflavonas, flavonóis, protocianidinas e 2,3-dihidroderivados das flavonas, chamados de flavononas, os quais podem ser interconvertíveis. Flavononas podem sofrer uma série de transformações, afetando o anel C heterocíclico, dando origem a outros membros da família dos flavonoides, incluindo antocianinas e catequinas (CAI; RAHN; ZHANG, 1997). A classificação dos flavonoides baseia-se na sua estrutura química. São compostos de baixo peso molecular, que compartilham um esqueleto comum difenólico, composto de dois anéis fenólicos (A e B) ligados por um anel heterocíclico (C). Os carbonos dos anéis A e C são numerados de 2 a 8, enquanto no anel B, são numerados de 2 a 6 (Figura 11). Esta estrutura básica permite vários padrões de substituições e variações, principalmente no anel C (MARTINES-FLORES, 2002).

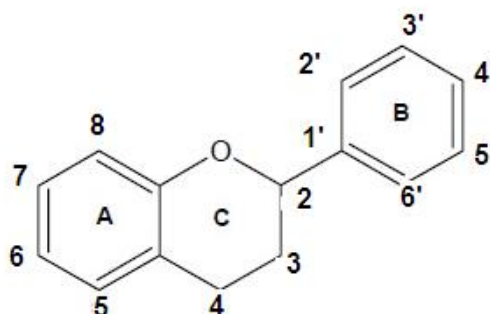


FIGURA 11 – ESTRUTURA GERAL DOS FLAVONOIDES.
FONTE: DAI(2006).

Embora os flavonoides sejam reconhecidamente substâncias com propriedades antioxidantes, eles podem ter ação pró-oxidante. Este comportamento pode ser explicado pela capacidade destes compostos em mudar o equilíbrio redox no interior das células. Em geral, a estrutura dos flavonoides possui um potencial redox em torno de 0,23 a 0,75 V, o que é suficiente para reduzir grandes quantidades de radicais livres oxidados, além de interagir com importantes moléculas biológicas. Porém, em contato com outras substâncias, a sua atuação

antioxidante ou pró-oxidante depende do potencial redox envolvido. Por exemplo, os flavonoides que possuem o grupo catecol no anel aromático B e a dupla ligação entre os carbonos 2 e 3, tem maior potencial redox quando comparados com o ácido ascórbico, o que os capacita a oxidá-lo. Por outro lado, as flavanonas, pela diferença de potencial redox, são capazes de reduzi-las. Barreca (2009) demonstrou que a quercetina e a rutina apresentam maior capacidade de sequestrar radicais livres quando comparadas com outros flavonoides, como a hesperidina, a neohesperidina e a hesperitina, demonstrando a importância da estrutura química do flavonoide para a sua ação antioxidante, com ênfase para a presença da dupla ligação, de grupamentos hidroxil no anel C e a ligação a um açúcar, como ocorre na rutina (Figuras 15 e 16).

A atividade antioxidante dos flavonoides sugere que estes compostos possam desempenhar importante papel protetor em doenças onde o estresse oxidativo está presente, aumentando o interesse pelos mesmos para o tratamento destas doenças (LOPÉZ-REVUELTA, 2006). Têm sido descritas várias atividades biológicas destes compostos, como propriedades vasodiladoras, antiinflamatórias, antivirais, efeitos anticarcinogênicos, além da inibição de fosfolipase A_2 , ciclooxigenase, lipoxigenase, glutathione redutase e xantina oxidase. A ação antioxidante dos flavonoides se deve à combinação de suas atividades quelantes, via estrutura orto-dihidroxi e de sequestrar radicais livres (MORIDANI *et al.*, 2003).

A capacidade de sequestrar radicais livres dos flavonoides se deve à estrutura polifenólica e ocorre em três estágios: formação do íon superóxido, geração de radicais hidroxil pela reação de Fenton e formação de radicais lipídicos, mecanismos que podem diminuir a peroxidação lipídica (RICE-EVANS, C.A; MILLER, N.J; PAGANGA, G, 1996). Dai (2006), estudando a eficiência anti-hemolítica de vários flavonoides, demonstrou que compostos que contêm a função catecol apresentam maior efeito protetor em comparação com outros compostos polifenólicos que não possuem esta estrutura.

Esta propriedade poderia ser explicada pelas (1) ligações intramoleculares do radical dihidroxi que são maiores e (2) pela menor energia de dissociação do radical catecol. Além disto, este radical demonstra grande facilidade de ser oxidado para sua forma orto-quinona (Figura 12). Este mesmo autor comparou a eficiência dos flavonoides isolados, na forma aglicona e de seus glicosídeos. Em seus resultados, demonstrou que a atuação antioxidante das agliconas é mais potente do

que a das formas de glicosídeos, principalmente na inibição da peroxidação lipídica e no efeito antioxidante sobre os eritrócitos humanos.

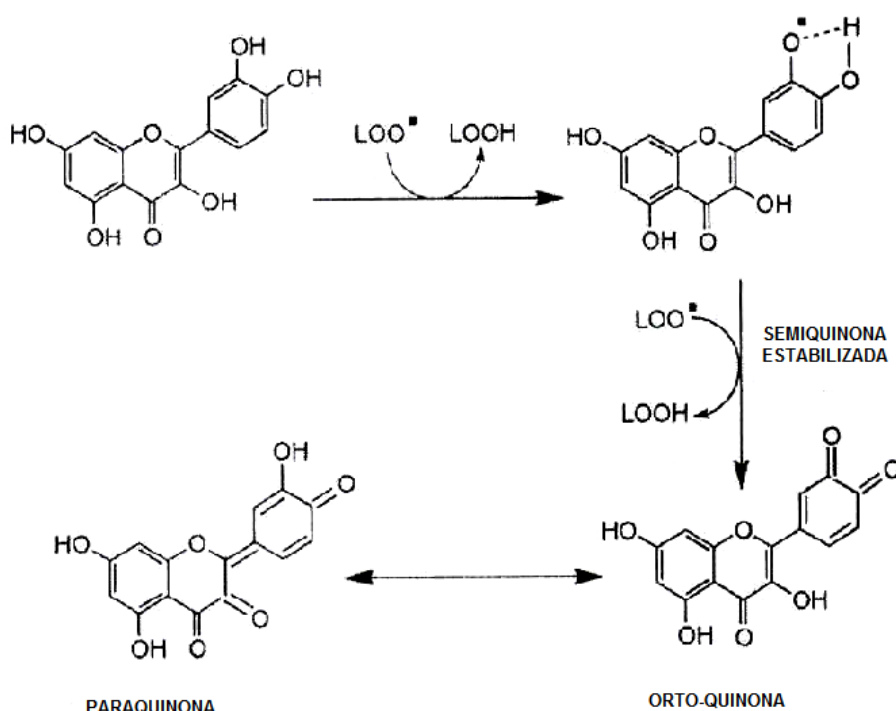


FIGURA 12 – MECANISMO DE SEQUESTRAMENTO DE ELÉTRONS PELA QUERCETINA
FONTE: DAI *et al.* (2006).

Dessa forma, o estudo destes compostos e sua introdução nas terapias antioxidantes atuais é um campo promissor, porém a sua utilização depende de um conhecimento aprofundado, principalmente das propriedades físico-químicas dos flavonoides, o que pode contribuir para a sua correta inclusão em esquemas terapêuticos.

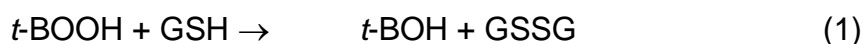
2.13 AGENTES OXIDANTES UTILIZADOS EM MODELOS EXPERIMENTAIS

2.13.1 *TERC*-BUTIL-HIDROPERÓXIDO (*t*-BHP)

O *t*-BHP é um peróxido orgânico (Figura 13) amplamente utilizado em processos de oxidação. O processo oxidativo induzido pelo *t*-BHP em eritrócitos pode ser descrito da seguinte forma: rápida oxidação da GSH (30-60 segundos) pela GSHPx; reação entre o *t*-BHP e a hemoglobina celular com formação de radicais

livres, que são imediatamente consumidos em reações de peroxidação lipídica (DOMANSKI; LAPSHINA; ZADODNIK, 2005).

Segundo Trotta, Sullivan e Stern (1983), como o *t*-BHP é uma molécula anfipática, facilmente se difunde pelas membranas do eritrócito. A redução enzimática do *t*-BHP é realizada pela GSH-Px, prevenindo tanto a oxidação da hemoglobina quanto a peroxidação lipídica; sendo que a reação resulta em oxidação do NADPH e estimulação da via das hexoses monofosfato, como demonstrado na equação abaixo:



O *t*-BHP pode, alternativamente, reagir com a hemoglobina, com formação de radicais livres e meta-Hb, como observado na equação abaixo:



A conversão da hemoglobina a meta-Hb é resultado da reação com o hidroperóxido, que se decompõe a radicais *t*-BO \cdot por uma cisão homolítica. Os produtos da decomposição do *t*-BHP via grupo heme são gerados em regiões muito próximas da membrana, sendo, portanto, promotores da peroxidação lipídica. Os radicais *terc*-butoxila (*t*-BO \cdot) reagem com os lipídeos de membrana e iniciam a peroxidação lipídica (LOOH).

Os efeitos do *t*-BHP nas proteínas de membrana dos eritrócitos foram estudados através de eletroforese em gel de poliacrilamida. O oxidante causou diminuição na intensidade das bandas das principais proteínas de membrana, com concomitante formação de um polipeptídeo de alto peso molecular, pelo fenômeno de *cross-linking*; bem como aumento da ligação da hemoglobina à membrana. A ação do *t*-BHP foi parcialmente prevenida pela via das hexoses monofosfato (TROTТА; SULLIVAN; STERN, 1983). Enzimas são inibidas pelas ERO formadas, sendo a Ca⁺² ATPase da membrana dos eritrócitos uma das mais sensíveis (BLAINE MOORE *et al.*, 1992).

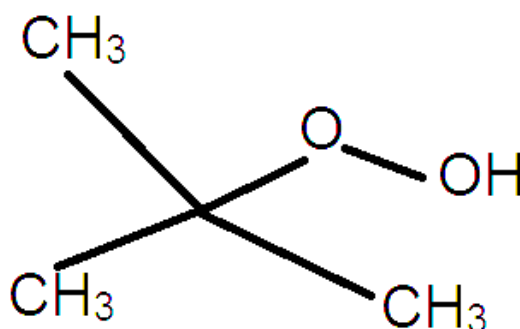
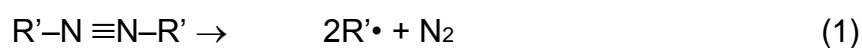


FIGURA 13 - ESTRUTURA QUÍMICA DO *t*-BHP (*tert*-BUTIL HIDROPERÓXIDO).
 FONTE: SIGMA ALDRICH (2011).

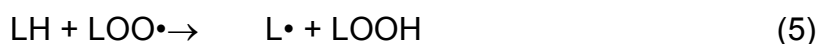
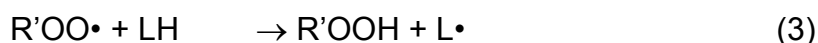
2.13.2 2,2- AZOBIS (AMIDINOPROPANO) DIHIDROCLORETO (AAPH)

O AAPH é um azo-composto hidrossolúvel (Figura 14) gerador de radicais livres que atacam a região aquosa da membrana. Os radicais livres gerados por decomposição térmica a 37°C são de uma única espécie e foram identificados como sendo radicais peroxila. A geração de radicais pelo AAPH é tempo e dose dependente, apresentando ação oxidante mais lenta em relação ao *t*-BHP. Uma vez gerados no meio extracelular, os radicais atacam a membrana eritrocitária, causando várias alterações oxidativas em lipídeos e proteínas presentes. Demonstrou-se que a hemólise causada pelo AAPH pode ser caracterizada principalmente por dois eventos: a lipoperoxidação e a redistribuição de proteína de banda 3 oxidada na membrana, devido a sua alteração conformacional. Esta redistribuição leva à formação de poros hemolíticos e o formato característico de disco bicôncavo dos eritrócitos é alterado, em grande parte para o formato esferocítico (SIMÃO; SUZUKAWA, 2007).

Segundo Banerjee *et al.* (2008), quando o AAPH é adicionado como iniciador, decompõe-se à temperatura fisiológica em soluções aquosas, gerando radical alquila (R^\bullet) que, em presença de oxigênio, converte-se ao radical peroxila correspondente (ROO^\bullet), como representado abaixo:



Em água, a 37° C, a meia vida do AAPH é de cerca de 175 horas, sendo que o mesmo gera radicais na taxa de $1,3 \times 10^{-6}$ [AAPH]/s. Esses radicais peroxila induzem a oxidação de lipídeos poliinsaturados (LH) das membranas dos eritrócitos, causando reação em cadeia denominada peroxidação lipídica, como demonstram as equações abaixo:



Como resultado da peroxidação lipídica, a membrana do eritrócito se danifica e ocorre perda de sua integridade, levando à liberação da hemoglobina e íons K⁺. Quando compostos antioxidantes estão presentes, podem sequestrar os radicais peroxila convertendo-os em espécies não reativas, e a hemólise pode ser inibida, como segue:



Segundo dados de Dai *et al.* (2006), a adição de AAPH induz rápida hemólise após um período de inibição, provavelmente devido à ação dos antioxidantes nativos presentes no eritrócito, já que em modelos micelares essa inibição não ocorre.

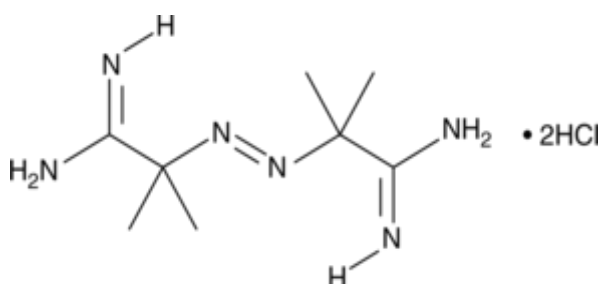


FIGURA 14 - ESTRUTURA QUÍMICA DO AAPH.
FONTE: SIGMA ALDRICH (2011).

2.14 FLAVONOIDES ESTUDADOS

2.14.1 QUERCETINA

A quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona) é um dos flavonoides mais facilmente encontrados em vinhos tintos, chás, cebolas, maçãs e tomates. A estrutura química deste composto garante os principais requisitos para uma eficiente atividade quelante e sequestradora de elétrons (Figura 15) (LOPEZ-REVUELTA, 2006). Em vários estudos sobre a quercetina, tem-se demonstrado efeito inibitório no crescimento de linhagens celulares de vários tipos de câncer, como: colo de útero, ovário, trato gastrointestinal, mama e em leucemias. Este flavonoide parece ter atividade inibidora da atividade da tirosina quinase, o que poderia evidenciar sua ação antitumoral (CAI; RAHN; ZHANG, 1997).

A alta atividade antioxidante da quercetina se deve à habilidade de impedir os processos radiculares nas células por alguns mecanismos já bem descritos:

- (1) pela sua ação sequestradora de O_2^- (HU; KITTS, 2000);
- (2) pela reação com radicais peroxil, inibindo assim a peroxidação lipídica (JOVANOVIC *et al.*, 1994);
- (3) pela ação quelante de ferro, diminuindo a formação de radicais OH (MOREL *et al.*, 1993).

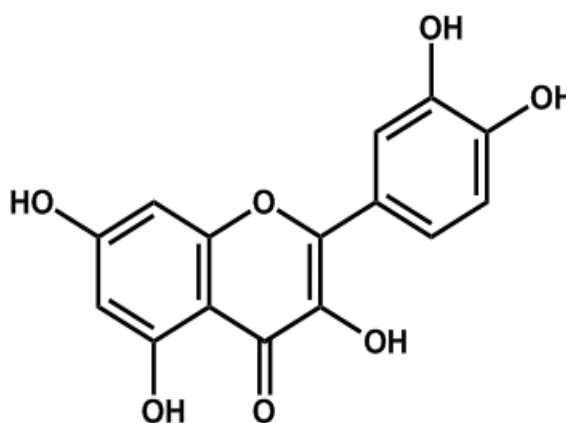


FIGURA 15 - ESTRUTURA QUÍMICA DA QUERCETINA
FONTE: SIGMA ALDRICH (2011).

2.14.2 RUTINA

Outro flavonoide importante é a rutina, que difere da quercetina por possuir uma molécula de açúcar (rutinose) na posição 3 do anel C (Figura 16). Por este motivo, algumas vezes recebe o nome de rutinosídeo de quercetina. São encontrados em cebolas, tomates, maçãs e chás. A presença da rutinose confere à molécula uma característica hidrofílica, atrapalhando assim sua interação com as membranas celulares (FERRALI *et al.*, 1997). Sua atividade antioxidante se deve ao fato de poder atuar como sequestradora de O_2^- e quelante de ferro (GRINBERG; RACHMILEWITZ; NEWMARK, 1994).

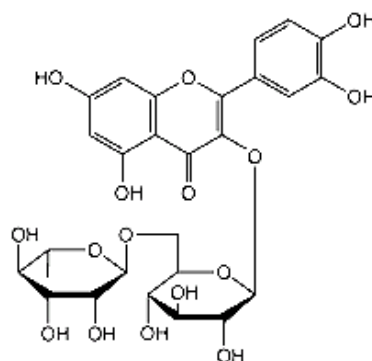


FIGURA 16 - ESTRUTURA QUÍMICA DA RUTINA
FONTE: SIGMA ALDRICH (2011).

2.14.3 HESPERIDINA

A hesperidina é uma flavanona encontrada em frutas cítricas, que apresenta variáveis efeitos farmacológicos, como atividade antioxidante, antiinflamatória, anti-alérgica, hipolipêmica, além de atividade anticarcinogênica. A pele e as partes membranosas das frutas cítricas, além de sucos com a polpa da fruta, são fontes ricas deste flavonoide. Apresenta baixa solubilidade em água, e peso molecular de 610,57 Da (Figura 17) (KALPANA; SRINIVASAN; MENON, 2009).

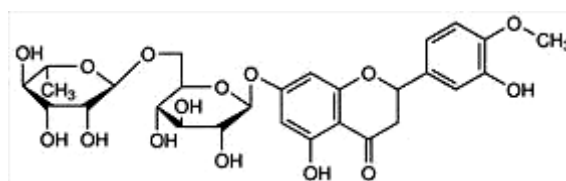


FIGURA 17 – ESTRUTURA QUÍMICA DA HESPERIDINA
FONTE: SIGMA ALDRICH (2011).

2.14.4 MIRICETINA

A miricetina é um flavonoide encontrado na dieta humana nas frutas, vegetais, chás e em vinhos tintos. Estudos sugerem que este composto possui atividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-viral além de propriedades como indutor de apoptose em células tumorais, bem como inibidor de proliferação celular. Possui grande numero de substituições hidroxil ao longo de sua estrutura (Figura 18).

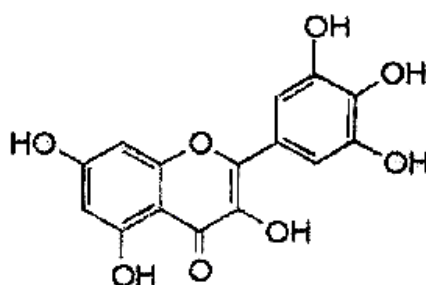


FIGURA 18 - ESTRUTURA QUÍMICA DA MIRICETINA
FONTE: SIGMA ALDRICH (2011).

2.15 TERAPIAS NO TRATAMENTO DA ANEMIA FALCIFORME

O entendimento da fisiopatologia e das formas de tratamento da anemia falciforme têm evoluído muito nos últimos anos. Os fenômenos vasooclusivos e isquêmicos não estão somente relacionados ao processo de polimerização, mas também a mecanismos de interação entre eritrócitos, endotélio, plaquetas, leucócitos e fatores plasmáticos, o que contribui para o desenvolvimento de novas terapias para a doença (VICHINSKY, 2002). Além disto, o estudo do estresse oxidativo na anemia falciforme tem contribuído para esclarecer melhor alguns mecanismos de ação de terapias já usadas no tratamento da doença, bem como sugerir novos tratamentos. A hidroxiureia, por exemplo, parece ter efeitos benéficos sobre a função endotelial, o que não era esperado, quando da introdução da droga como opção terapêutica da doença (ASLAN; THORNLEY-BROWN; FREEMAN, 2000).

A falcização pode ser interrompida de várias maneiras. A hidroxiureia, o medicamento mais prescrito no tratamento da doença, causa mielossupressão, induz a síntese de hemoglobina fetal, o que aumenta a sobrevivência do eritrócito e diminui a polimerização. A droga é ativa quando administrada por via oral, é segura e traz benefícios na maioria dos pacientes com anemia falciforme. Outro agente que modula a síntese da hemoglobina fetal é a 5-azacitidina, a qual aumenta a expressão do gene gama por hipometilação dos seus promotores. Porém, por possuir ação tumorigênica, tem seu uso desestimulado. A decitabina, um análogo da azacitidina, aumenta tanto a hemoglobina total quanto a fetal e pode ser uma opção, em pacientes cuja condição é resistente ao tratamento com hidroxiureia (VICHINSKY, 2002).

O uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina (I-ECA) e de agentes que diminuem a concentração de homocisteína plasmática tem efeitos positivos no tratamento da doença. Os I-ECA apresentam efeito, em mecanismo secundário, de aumento de bradicininas, que estimulam a liberação de óxido nítrico, resultando em vasodilatação. Altos níveis de homocisteína, observados em pacientes com anemia falciforme, têm sido relacionados com a deficiência de folatos, vitamina B₁₂ e piridoxina. Nestes casos, a administração de tais suplementos pode ser útil para o tratamento da doença (ASLAN; THORNLEY-BROWN; FREEMAN, 2000).

Outros esquemas terapêuticos atuam na prevenção da desidratação celular. No processo de polimerização ocorrem danos à membrana eritrocitária, com consequente desidratação e formação de células mais densas, associadas aos fenômenos de vasooclusão e anemia. Vários mecanismos que levam à desidratação celular têm sido estudados, incluindo o canal de cálcio-potássio ativado, descrito por Gardos. Quando da polimerização, ocorre um aumento do cálcio citosólico, o que pode ser inibido por bloqueadores do canal de Gardos, como o clotrimazol, minimizando os efeitos deletérios da falcização (VICHINSKY, 2002).

O uso de antiinflamatórios e de medicamentos contra a adesão celular são opções, com perspectivas promissoras, no tratamento da anemia falciforme. A ativação de fatores de transcrição pode levar à expressão de genes ditos pró-inflamatórios, pró-adesivos e pró-coagulantes, como o NFkB, que estão aumentados na anemia falciforme. Portanto, inibidores de NFkB, como a sulfasalazina, diminuem a expressão de moléculas inflamatórias e pró-adesivas e podem ser úteis como

estratégia terapêutica (STUART; NAGEL, 2004). A administração de sulfasalazina, diminui significativamente a expressão de VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina (ASLAN; FREEMAN, 2007b).

O óxido nítrico é um fator crítico na fisiopatologia da anemia falciforme e por isto é uma modalidade importante de esquema terapêutico (VICHINSKY, 2002). Esta molécula é um sinalizador celular importante, cujo precursor é a L-arginina, sendo continuamente produzido pelo endotélio pela ação da enzima NO sintetase, a qual é funcionalmente dependente de cálcio. O óxido nítrico aumenta a produção de GMP-c levando à desfosforilação das cadeias leves de miosina, induzindo ao relaxamento muscular e à vasodilatação (STUART; NAGEL, 2004). Por outro lado, o óxido nítrico regula a adesão endotelial, a ativação de plaquetas e leucócitos, que são fatores importantes para os episódios isquêmicos (VICHINSKY, 2002).

A biodisponibilidade do óxido nítrico é mantida pelo equilíbrio entre a sua produção e o seu consumo endotelial, sendo que este sistema está em desequilíbrio na anemia falciforme. Este quadro pode estar relacionado com o sequestro do óxido nítrico tanto pela hemoglobina livre no plasma quanto pelas ERO, além das baixas concentrações do seu substrato, a L-arginina (STUART; NAGEL, 2004). A inalação de óxido nítrico já foi aprovada pelo FDA para o tratamento de crianças com anemia falciforme, por reduzir a gravidade e a duração das crises vasooclusivas nestes pacientes (WEINER *et al.*, 2003). A correção da deficiência da L-arginina pode ser possível pela sua administração, via oral, o que pode melhorar a biodisponibilidade do óxido nítrico. Morris *et al.* (2003), entretanto, demonstrou que esta correção não ocorre com a administração isolada da L-arginina, dependendo de uma terapia conjunta com hidroxíurea. Na Figura 19 resumem-se os novos esquemas terapêuticos que podem ser utilizados no tratamento da anemia falciforme, enfatizando a importância do entendimento da homeostase do óxido nítrico na fisiopatologia da anemia falciforme.

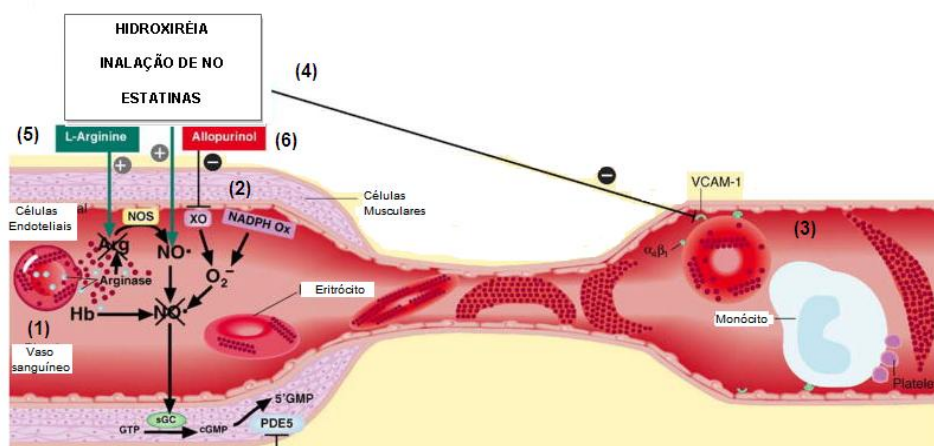


FIGURA 19 - NOVOS ESQUEMAS TERAPÊUTICOS PARA O TRATAMENTO DA ANEMIA FALCIFORME.

FONTE: (MACK; KATO, 2006).

NOTA: (1) A hemólise que ocorre na anemia falciforme libera hemoglobina e arginase dos eritrócitos. A hemoglobina livre consome rapidamente o óxido nítrico e a arginase quebra a arginina, substrato para a produção de óxido nítrico. (2) A xantina oxidase e a NADPH oxidase estão aumentados na anemia falciforme (3) Sob condições de hipóxia, a polimerização da hemoglobina S resulta em células mais rígidas que impedem o fluxo sanguíneo normal. Como resultado do estado hemolítico, reticulócitos são liberados no sangue periférico, ligando-se ao endotélio via VCAM-1. (4) a hidroxiureia e a inalação do óxido nítrico podem ser doadores de óxido nítrico e podem diminuir a expressão de moléculas de adesão celular. (5) a suplementação de L-arginina pode melhorar a quantidade de substrato para a produção de óxido nítrico (6) O allopurinol inibe a xantina oxidase que controla a produção de íons superóxido, o que diminui os danos celulares.

O evidente estado pró-coagulante da anemia falciforme estimula o uso de drogas anticoagulantes para minimizar os efeitos deletérios da doença. Estudos demonstraram que o uso prolongado de pequenas doses de varfarina ou de heparina pode reduzir a atividade protrombínica, com redução das crises dolorosas em pacientes de anemia falciforme (SALVAGGIO; ARNOLD; BANOVA, 1963; WOLTERS *et al.*, 1995).

2.15.1 HIDROXIUREIA

A hidroxiureia (HU) tem sido alvo de interesse científico há mais de 100 anos. A droga é utilizada em várias doenças mieloproliferativas e neoplásicas. A fácil administração, a baixa toxicidade, bem como o baixo custo e os múltiplos benefícios de ordem clínica, garantem à hidroxiureia lugar de destaque em vários esquemas terapêuticos. A partir de 1999, o *US Food and Drug Administration* (FDA)

aprovou o uso da hidroxiureia em adultos com anemia falciforme de gravidade clínica (KOVACIC, 2011).

A administração da HU é a mais importante terapia para a anemia falciforme. Os efeitos farmacológicos que contribuem para sua eficácia terapêutica incluem a indução da produção da hemoglobina fetal, o aumento do teor de água no interior do eritrócito e a diminuição da adesão do eritrócito ao endotélio pela diminuição de moléculas de adesão endotelial (SILVA *et al.*, 2011). A terapia com HU diminui as crises vaso-oclusivas, aumentando o tempo entre as crises, diminuindo também a incidência da síndrome torácica e a necessidade de transfusões sanguíneas. O mecanismo para obtenção destes benefícios inicialmente foi relacionado ao aumento da proporção de células contendo hemoglobina fetal e do volume corpuscular médio dos eritrócitos, reduzindo o potencial de polimerização da hemoglobina (ASLAN; THORNLEY-BROWN; FREEMAN, 2000).

O maior entendimento sobre o metabolismo da hidroxiureia tornou mais claros alguns dos seus efeitos. No primeiro passo de sua metabolização, a HU é oxidada para formar o carbamil nitroso, que por sua vez sofre hidrólise formando compostos intermediários como o óxido nítrico (NO) e o ácido nítrico (HNO). O NO pode ser gerado também pela peroxidação dependente de H_2O_2 da HU, na presença de proteínas contendo cobre. Este mecanismo é a base molecular para a atividade antitumoral da HU. O metabolismo da HU é muito similar ao do ácido hidroxâmico, com produção de HNO e NO e acil nitroso. A afinidade do acil nitroso com radicais livres pode explicar o grande interesse sobre o mecanismo de ação da droga em algumas condições fisiopatológicas (KOVACIC, 2011).

Tem sido demonstrado que a HU pode diminuir os danos causados pelo estresse oxidativo. O aumento da produção de ERO altera a homeostase do óxido nítrico, fator importante da patogênese da anemia falciforme. Neste contexto, a HU parece ser um doador de óxido nítrico pela oxidação exercida pelos grupamentos heme, o que também pode contribuir para os efeitos benéficos desta droga (KONEIÉ, 2011).

Pacientes com anemia falciforme apresentam aumento do NO, nitratos e nitritos após a administração de HU. A estimulação da sinalização do GMP-c é o provável mecanismo que ativa o gene para a maior produção de NO. Outro mecanismo, relacionado a HU, que pode elevar a concentração de NO seria mediada pelo aumento da hemoglobina fetal (HbF)(KOVACIC, 2011). Silva (2011)

demonstrou que pacientes SS tratados com HU apresentaram aumento na atividade da enzima catalase e diminuição significativa da peroxidação lipídica.

A redução da taxa de mortalidade dos pacientes da anemia falciforme que utilizam a HU tem sido alvo de vários estudos. Bakanay (2005) relatou a importância da rápida introdução da terapia com HU para aumentar a sobrevivência destes pacientes. Os haplótipos BAN e Camarões, juntamente com a introdução tardia da droga, como esquema terapêutico, foram fatores que aumentaram a taxa de mortalidade entre os pacientes de anemia falciforme, mesmo em tratamento com a HU, sugerindo a interferência destes fatores na avaliação da diminuição da mortalidade exercida pela droga (BAKANAY *et al.*, 2005).

Existem evidências que a saturação de oxigênio cerebral nos pacientes com anemia falciforme seja 20 a 30% menor quando comparados a indivíduos normais, o que pode ser explicado pelo fluxo microvascular anormal dos eritrócitos falciformes. Neste aspecto, a HU parece melhorar o fluxo sanguíneo e a oxigenação tecidual secundariamente a um aumento de NO, o que melhora a taxa de oxigenação cerebral (TAVAKKOLI *et al.*, 2005).

A HU também pode ser utilizada no tratamento de outras hemoglobinopatias, como na associação hemoglobina S e hemoglobina C (SC). Em pacientes SC, a droga demonstrou diminuição do processo hemolítico, com diminuição da bilirrubina plasmática e aumento da razão hemoglobina do eritrócitos/hemoglobina no reticulócito (ERIHb/RET/Hb), taxa esta que mensura indiretamente a sobrevivência do eritrócito. Além disto, a HU aumenta o volume tanto do eritrócito quanto do reticulócito, o que pode diminuir a densidade da população eritrocitária na doença SC. A diminuição da densidade celular, pode inibir a polimerização, melhorando o curso clínico da doença (STEINBERG; NAGEL; BRUGNARA, 1997).

O interesse da comunidade científica pela anemia falciforme existe há mais de 100 anos e apesar de todos os conhecimentos adquiridos, algumas questões a respeito da doença permanecem sem a completa explicação. As razões para a grande variabilidade clínica da doença é um dos pontos que ainda precisam de melhor entendimento que motivaram a realização deste estudo. Pela complexidade molecular e a tendência oxidativa relatada na anemia falciforme, considerou-se relevante analisar o efeito antioxidante de quatro flavonoides (quercetina, rutina, hesperidina e miricetina) em eritrócitos de pacientes com anemia falciforme, atendidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR), com o

intuito de investigar se estes compostos têm efeito protetor contra o estresse oxidativo e se os haplótipos estudados podem influenciar na resposta aos mesmos. Desta forma, a partir dos resultados deste trabalho, espera-se poder indicar o uso dos flavonoides em estudo para ser utilizado como terapia auxiliar no tratamento de pacientes de anemia falciforme.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o processo oxidativo em eritrócitos de indivíduos pacientes de Hemoglobina S.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil haplotípico dos pacientes da doença falciforme atendidos pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia (HEMEPAR);
- Relacionar os diferentes haplótipos da doença falciforme com os níveis de Hemoglobina Fetal;
- Verificar a oxidação da hemoglobina e da peroxidação lipídica da membrana eritrocitária submetida ao estresse oxidativo pelo *terc*-butil hidroperóxido;
- Estudar os efeitos *in vitro* de quercetina, rutina, hesperidina e miricetina sobre o metabolismo oxidativo em eritrócitos normais e de pacientes de hemoglobina S, ambos submetidos ao estresse oxidativo pelo *terc*-butil hidroperóxido;
- Analisar o efeito do estresse oxidativo induzido pelos oxidantes *terc*-butil hidroperóxido (*t*-BHP) e AAPH nos diferentes haplótipos;
- Estudar o efeito antioxidante *in vitro* da quercetina, rutina, hesperidina e miricetina nos diferentes haplótipos da doença falciforme.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Foram utilizados os reagentes *tert*-butilhidroperóxido (*t*BHP), dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina) (AAPH), ácido metafosfórico e ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (reagente DTNB), obtidos da SIGMA-ALDRICH; NaCl, Na₂HPO₄, KCl, saponina, ácido tricloroacético, ácido tiobarbitúrico e NaOH, da VETEC; EDTAK₃, da QEEL; e KH₂PO₄, da SYNTH. Para determinação da atividade enzimática da G6-PD foi utilizado kit da RANDOX.

Os flavonoides quercetina (Q4951 - Sigma), rutina (04677 Sigma), hesperidina (H5254 Sigma) e miricetina (M6760 Sigma) utilizados para tratamento de eritrócitos *in vitro*, foram obtidos comercialmente da SIGMA-ALDRICH.

4.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL

As amostras de sangue utilizadas no estudo foram coletadas após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 1) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (CEP-SD), sob protocolo CEP/SD 778.113.09.08 e CAAE 0048.0.091.000-09, pelos indivíduos sujeitos da pesquisa ou por seus responsáveis legais(ANEXO 2).

O grupo controle foi constituído por 15 voluntários saudáveis, 10 do gênero feminino (66,6%) e 5 do gênero masculino (33,3%), com idade entre 23 e 60 anos, entre alunos, professores e servidores técnicos administrativos da UFPR. Os fatores de inclusão do grupo controle foram: valores hematimétricos normais, histórico familiar negativo para doenças hematológicas e ausência de uso de qualquer medicamento com propriedades oxidantes. As amostras de sangue foram coletadas em EDTAK₃.

Para o grupo de pacientes de anemia falciforme atendidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR) foram coletadas amostras de

10 ml de sangue venoso em EDTAK₃ (1mg/ml). Este grupo foi constituído por 29 pacientes, sendo 16 do gênero masculino (55,2%) e 13 do gênero feminino (44,8%), com idades entre 2 a 49 anos. Todos os pacientes com anemia falciforme que participaram do estudo recebiam algum tipo de medicação, sendo a hidroxiureia (0,5 g a 1,0 g/dia) a principal forma de tratamento. Além da hidroxiureia, alguns pacientes faziam uso de ácido fólico e apenas 1 deles associava a este tratamento o uso de desferoxamina. Como critério de inclusão, todos os pacientes não haviam recebido transfusão de unidades eritrocitárias por no mínimo de 30 dias antes da coleta.

4.3 ISOLAMENTO DOS ERITRÓCITOS

Os eritrócitos das amostras de eritrócitos de indivíduos normais e de pacientes com Hemoglobina S foram isoladas segundo a técnica descrita por CHAVES *et al.*, 2008. Centrifugou-se as amostras de sangue venoso coletado em EDTA K₃ a 4º C em 1000 x g por 10 minutos, retirando-se o plasma e a camada de leucócitos e, em seguida, lavou-se os eritrócitos três vezes, por centrifugação, com solução gelada de NaCl 154 mmoles/l. Os eritrócitos lavados foram fracionados em alíquotas de acordo com a necessidade de cada técnica. Ressuspendeu-se os eritrócitos em solução de tampão fosfato salina (PBS) 10 mmoles/l pH 7,4 para valores de volume globular próximos a 40%, para a determinação de GSH e a 10% para as demais determinações. A confirmação dos valores de volume globular e concentração de hemoglobina foram realizadas em analisador hematológico Coulter T-890.

4.4 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS COM OS POLIFENOIS TESTADOS

Preparou-se soluções estoques de cada flavonoides a ser testado. Quercetina, rutina, hesperidina e miricetina, foram dissolvidas em água purificada com DMSO (1/1) na concentração de 0,1 mol/l. As soluções estoques eram diluídas, imediatamente antes do uso, em tampão fosfato salina (PBS) 10 mmoles/l pH 7,4 nas concentrações a serem testadas, de acordo com o Quadro 3. As suspensões

de eritrócitos foram aliquotadas e centrifugadas por 5 minutos a 1200 x g, retirando-se o volume de sobrenadante correspondente ao volume de solução reagente a ser adicionado, não se alterando assim o volume globular final.

QUADRO 3 – CONCENTRAÇÕES DOS POLIFENÓIS A SEREM UTILIZADAS NO PROJETO

	QUERCETINA (μ moles/l)	RUTINA (μ moles/l)	HESPERIDINA (μ moles/l)	MIRICETINA (μ moles/l)
METAHEM.	40/100	40/100	40/100	40/100
GSH	100	100	100	100
TBARS	50/100	50/100	50/100	50/100
G6-PD	200	200	200	200
EROS	30/50/100	30/50/100	30/50/100	30/50/100
HEMÓLISE	50/100	50/100	50/100	50/100

4.5 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS COM AS SUBSTÂNCIAS OXIDANTES: *TERC*-BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) E 2,2'AZOBIS (2-METIL-PROPIONAMIDINA) DIHIDROCLORO (AAPH)

O *t*-BHP foi dissolvido em tampão fosfato salino (PBS) (NaCl 137 mmoles/l; KH_2PO_4 1,47 mmoles/l; Na_2HPO_4 8,17 mmoles/l e KCl 2,70 mmoles/l) em pH 7,4. As concentrações dos oxidantes variaram de acordo com as determinações a serem realizadas. As concentrações finais de *t*-BHP foram de 1 mmol/l para a metahemoglobina, 1 mmol/l para GSH, 3 mmoles/l para G6-PD, 2 mmoles/l para TBARS e para as ERO 75 μ moles/l.

O AAPH foi dissolvido em tampão fosfato 67 mmoles/l, pH 7,6, com glicose 200 mg/dl e foi utilizado para a determinação da porcentagem de hemólise, sendo que a concentração final utilizada foi de 100 mmoles/l.

4.6 DETERMINAÇÕES LABORATORIAIS

4.6.1 DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DO *CLUSTER* DO GENE β^S .

O DNA genômico das amostras do presente estudo foi extraído de leucócitos de sangue periférico (*Buffy Coat*) pelo método *salting out* (LAHIRI, 1991), com modificações. O Protocolo desta técnica consta, de forma detalhada, no Apêndice 1.

O estudo dos haplótipos da mutação β^S no gene da cadeia globínica foi realizado através da digestão com enzimas específicas, segundo Sutton (1989), após obtenção dos amplicons por meio da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com condições otimizadas para cada par de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificar as regiões de interesse. Sendo assim, foram estudados os seguintes sítios gênicos:

- HindIII : na região IVS 2 do gene gama adenina;
- HindIII: na região IVS2 do gene gama guanina;
- HincII :no pseudogene;
- HincII: na extremidade 3' do pseudogene β ;
- Hinfl: na extremidade 5' do pseudogene β ;
- TaqI: na região entre os genes gama adenina e guanina;
- XmnI: na região entre o gene embrionário ϵ e gene gama guanina.

As posições desses sítios de polimorfismos gênicos situados no complexo da beta globina estão representadas na Figura 20.

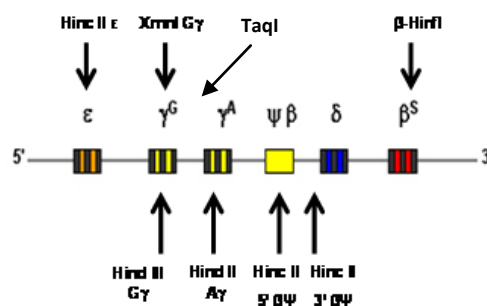


FIGURA 20 – SÍTIOS DE AÇÃO DAS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO AO LONGO DO GENE BETA.

4.6.1.1 OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que amplificaram as diferentes regiões do gene beta e que foram utilizadas no presente trabalho, foram descritas por Muralitharan *et al.* (2003). A sequência dos primers e os seus sítios polimórficos estão descritos no Quadro 4.

A sequência utilizada como referência para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores foi obtida comercialmente (Sigma®), após conferência destas sequências no depósito do GenBank para o gene beta (NCBI Reference sequence: NG_000007.3).

QUADRO 4 – SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS* PARA OS DIFERENTES SÍTIOS DE RESTRIÇÃO.

ENZIMA DE RESTRIÇÃO	SEQUÊNCIA DO PRIMER (5'→3')
Hinc IIε	TCT CTG TTT GAT GAC AAA TTC AGT CAT TGG TCA AGG CTG ACC
XmnI Gy	AAC TGT TGC TTT ATA GGA TTT T AGG AGC TTA TTG ATA ACT CAG AC
Hind III Gy	AGT GCT GCA AGA AGA ACA ACT ACC CTC TGC ATC ATG GGC AGT GAG CTC
Taq I	CCT GAC CAG GAA CCA GCA GA CTT ATC GGA GGC AAG CTG TAT CT
Hind III Ay	TGC TGC TAA TGC TTC ATT ACA A TAA ATG AGG AGC ATG CAC ACA C
Hinc II 5' Ψβ	TCC TAT CCA TTA CTG TTC CTT GAA ATT GTC TTA TTC TAG AGA CGA TTT
Hinc II 3' Ψβ	TCT GCA TTT GAC TCT GTT AGC GGA CCC TAA CTG ATA TAA CTA
B-Hin fI	AGT AGA GGC TTG ATT TGG AGG GTT AAG GTG GTT GAT GGT AAC

4.6.1.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction*, PCR) foi utilizada para amplificar as 8 diferentes regiões do gene beta. A técnica foi realizada em volume de 10μl e os parâmetros temperatura de hibridação/anelamento/*melting* (*T_m*), concentrações de Mg⁺²_(aq) e tempos de ciclagem foram otimizados de acordo com cada experimento. O equipamento *Eppendorf Mastercycler Gradient* (*Eppendorf*) foi utilizado para a realização dos ensaios de PCR (Quadro 5).

A eletroforese dos produtos de PCR foi realizada em gel de agarose a 1,0% e os amplicons gerados foram corados com brometo de etídeo e fotodocumentados utilizando sistema de fotodocumentação UVP para confirmar tanto a amplificação dos produtos de PCR quanto a qualidade destes.

QUADRO 5 - CONDIÇÕES PARA A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO FINAL	VOLUME
Água reagente estéril	-----	6 µl
Tampão TAQ 10 X	1X	1,0 µl
Oligonucleotídeos Iniciadores Forward	10 pmol/µl	0,5 µl
Oligonucleotídeos Iniciadores Reverse	10 pmol/µl	0,5 µl
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	0,6 µl
dNTP 5 mM	0,2 mM	0,4 µl
Taq DNA Polimerase (5U/ µl)	4 U	0,4 µl
DNA genômico (100 ng/µl)	100 ng/20 µl	0,7 µl

A programação de tempo e temperatura para o termociclador está descrita no Quadro 6.

QUADRO 6 - PROGRAMAÇÃO DE TEMPO E TEMPERATURA PARA O TERMOCICLADOR

TERMOCICLADOR – ETAPAS DA PCR	TEMPERATURA	TEMPO (T) (SEGUNDOS)
1- Desnaturação inicial	94°	120
2- Desnaturação	94°	30
3- Hibridação (anelamento) dos primers	X	40
4- Extensão	72°	40
5- Repetir 34 vezes as etapas 2,3 e 4.	-----	-----
6- Extensão final	72°	600
7- Hold (resfriamento)	4°	**

4.6.1.3 ANÁLISE COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Para a técnica de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorfism*) foram utilizados 1,75 µl do produto de PCR. A análise das enzimas de restrição consistiu nos seguintes componentes para um volume final de reação de 7 µl : 1,75

μl de produto de PCR, 0,25 μl da enzima de restrição, 0,7 μl de tampão 10X e 4,38 μl de água. A mistura foi incubada por 16 horas a 37°C (estufa). Após a incubação, a análise da reação foi avaliada através de gel de agarose a 3,5% com tampão de corrida TBE 1 x.

Os quadros 7, 8 e 9 apresentam respectivamente as temperaturas de *Melting* dos diferentes sítios de restrição, os tamanhos dos amplicons com e sem seus sítios de restrição e as condições de ensaio da PCR.

QUADRO 7 – TEMPERATURA DE MELTING DOS DIFERENTES SÍTIOS DE RESTRIÇÃO.

SÍTIO DE RESTRIÇÃO	TEMPERATURA DE MELTING(°C)
Hinc IIε	63,1
Xmnl Gy	59,5
Hind III Gy	69,6
Taq I	64
Hind III Ay	65
Hinc II 5' Ψβ	67,5
Hinc II 3' Ψβ	58
B-Hin fl	60,5

QUADRO 8 – ANÁLISE DOS AMPLICONS E O TAMANHO DOS FRAGMENTOS COM E SEM OS SÍTIOS DE RESTRIÇÃO.

Sítio de restrição	Tamanho do produto (pb)	Ausência do sítio de restrição (pb)	Presença do sítio de restrição (pb)
Hinc IIε	760	760	446 + 312
Xmnl Gy	655	655	450 + 205
Hind III Gy	328	328	91 + 237
Taq I	960	960	753 + 207
Hind III Ay	761	761	435 + 325
Hinc II 5' Ψβ	794	794	104 + 690
Hinc II 3' Ψβ	620	620	540 + 80
B-Hin fl	638	336 + 302	123 + 213 + 302

QUADRO 9 - CONDIÇÕES DE ENSAIO PARA A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.

SÍTIO DE RESTRIÇÃO	AMPLICON (TAMANHO pb)	CONCENTRAÇÃO DO GEL DE AGAROSE (%)	TEMPO DE ELETROFORESE (h)	VOLTAGEM (V)	AMPERAGEM (mA)
Hinc IIε	760	1	1	120	40
Xmnl Gy	655	1	1	120	40
Hind III Gy	328	1	1	120	40
Taq I	960	1	1	120	40
Hind III Ay	761	1	1	120	40
Hinc II 5' Ψβ	794	1	1	120	40
Hinc II 3' Ψβ	620	1	1	120	40
B-Hin fl	638	1	1	120	40

4.6.2 HEMOGRAMA

Os dados do eritrograma, contagem de leucócitos e plaquetas foram obtidos no analisador hematológico Coulter T-890 que utiliza como método de análise celular a impedância elétrica.

4.6.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA FETAL

A determinação da concentração de hemoglobina fetal foi realizada em todas as amostras em estudo pelo teste da desnaturação alcalina (NAOUM, 1997).

4.6.4 DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

4.6.4.1 PRINCÍPIO DO MÉTODO

A detecção de ERO intracelulares foi obtida pelo uso de sonda lipossolúvel, 2,7 – diclorodihidrofluorescência diacetato (DCFH-DA), que se difunde para dentro das células, e é diacetilada por esterases, para formar 2,7-

diclorodihidrofluorescência (DCFH), a qual se torna disponível como substrato aos radicais livres formados no meio intracelular (Figura 21). Após oxidação forma-se DCF, que emite fluorescência, medida em fluorímetro. A técnica apresenta alta sensibilidade de detecção de ERO e a sonda utilizada apresenta alta especificidade para H_2O_2 . O método descrito abaixo é adaptado de López-Revuelta *et al.*(2006).

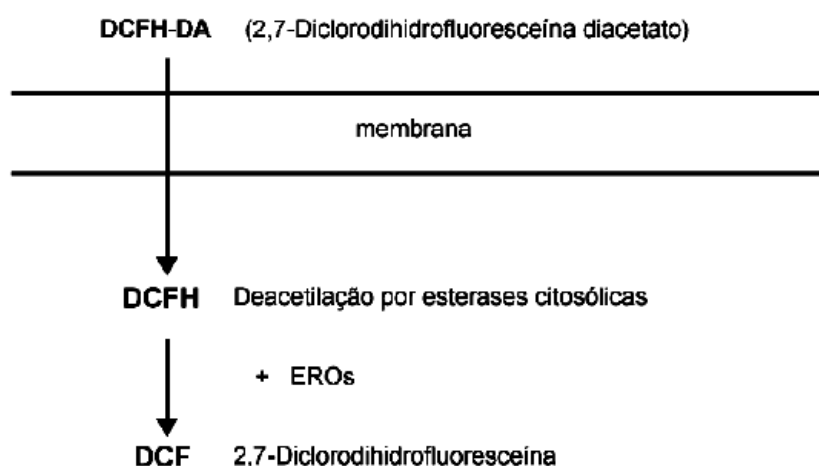


FIGURA 21 – PRÍNCÍPIO DO MECANISMO DE FUNCIONAMENTO DA SONDA DCFH-DA
FONTE: (SILVEIRA, 2004).

4.6.4.2 TÉCNICA

A suspensão de eritrócitos a 10% foi incubada com 5 μ l de sonda DCFH-DA 10 μ moles/l por 30 minutos a 37° C, sob agitação, na ausência de luz. Após a incubação com a sonda, a suspensão de eritrócitos foi diluída 1:10 em PBS 10 mmoles/l pH e incubada com concentrações crescentes dos polifenóis em placa de 96 poços por 30 minutos a 37°C. Analisou-se amostras sem tratamento como controle. As determinações foram realizadas em quadruplicata. O agente oxidante *t*-BHP foi adicionado na concentração de 75 μ moles/L e, após 15 minutos, a placa foi submetida a leitura em 488 nm (excitação) e 528 nm (emissão) em fluorímetro Synergy HT (Biotek) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFPR.

4.6.4.3 CÁLCULO

A produção de ERO foi expressa em unidades de fluorescência por grama de hemoglobina. A concentração de hemoglobina foi determinada na suspensão de eritrócitos a 10%, pelo método da cianometahemoglobina, no analisador hematológico Coulter T-890.

4.6.5 DETERMINAÇÃO DAS PORCENTAGENS DE HEMÓLISE

4.6.5.1 PRINCÍPIO DO MÉTODO

A suscetibilidade aumentada ao estresse oxidativo ocasionado por fatores externos ou pela auto-oxidação da hemoglobina leva a uma série de eventos que culminam no aumento da concentração da hemoglobina extracelular do sobrenadante das suspensões dos eritrócitos. O método descrito abaixo é adaptado de Banerje (2008).

4.6.5.2 TÉCNICA

Suspensões de eritrócitos a 10% foram separadas em alíquotas de 200 µl em microtubos *Eppendorf*, adicionando-se 200 µl de AAPH para concentração final de 40 mmoles/l e submetidos a incubação a 37°C por 3 horas. Para testar a proteção da hemólise pelos polifenóis, as amostras foram previamente incubadas com 200 µl de crescentes concentrações dos flavonoides.

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 1200 x g por 5 minutos, e a extensão da hemólise foi determinada espectrofotometricamente através da medida da absorbância do sobrenadante a 540 nm, em leitor de placas de ELISA Thermoplate. Como referência, os eritrócitos foram tratados com água destilada e a absorbância do hemolisado foi considerada como 100% de hemólise.

4.6.5.3 CÁLCULO

A hemólise (%) foi obtida através da comparação entre as absorbâncias de cada tubo, em relação à absorbância da amostra exposta a água, na ausência de antioxidante, considerado como 100% de hemólise.

4.6.6 DETERMINAÇÃO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA PELA DETECÇÃO DE SUSBTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

4.6.6.1 PRINCÍPIO DO MÉTODO

O princípio deste ensaio está na reação de produtos de peroxidação lipídica com o ácido tiobarbitúrico, formando um produto colorido rosa, que pode ser monitorado espectrofotometricamente de 532 a 535 nm. Um dos principais produtos formados no processo oxidativo é o malondialdeído (MDA) (Figura 22). Neste ensaio, uma molécula de MDA reage com duas moléculas de TBA em pH 1-2 e a 100° C, formando uma base de Schiff.

4.6.6.2 TÉCNICA

Empregou-se a técnica de Stocks & Dormandy (1971). A 600 µL de suspensão de eritrócitos a 10% adicionou-se soluções com concentrações crescentes dos polifenóis, incubando-se por 1 hora a temperatura ambiente, sob constante agitação. Após este período de incubação, acrescentou-se *t*-BHP para concentração final de 2 mmoles/l, mantendo-se por 15 minutos à temperatura ambiente, sob homogeneização. A reação oxidativa foi paralisada pela adição de 250 µL de ácido tricloroacético 25%. Após a homogeneização, centrifugou-se por 1 minuto a 1200 x g. Separou-se 600 µL do sobrenadante, adicionou-se a mesma quantidade de ácido tiobarbitúrico 10 g/l em NaOH 0,05 mmoles/l. Esta solução foi aquecida a 100 °C por 15 minutos, verificando-se a formação de produto colorido. A

proteção dos polifenóis contra a peroxidação lipídica foi observada em determinação da absorbância a 532 nm, após resfriamento das amostras, descontando-se a absorbância da amostra a 600 nm, para eliminar interferentes. Analisaram-se ainda amostras sem tratamento, como controle.

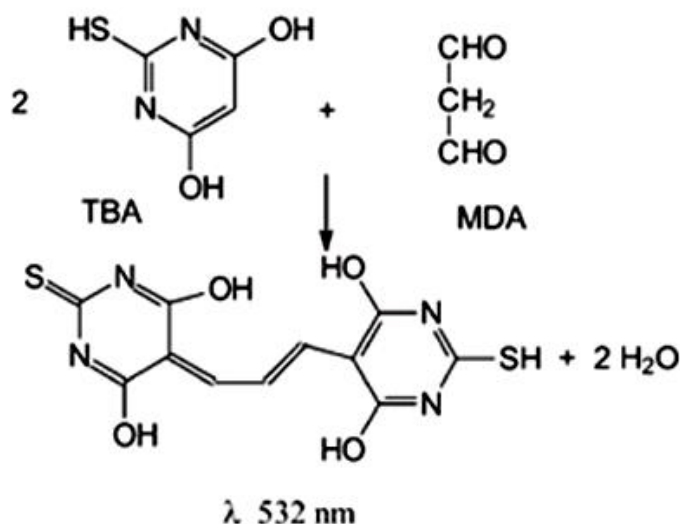


FIGURA 22 – REAÇÃO UTILIZADA PARA DETECÇÃO DE MDA EM PLASMA HUMANO.
 NOTA: O ÁCIDO TIOBARBITÚRICO REAGE COM O MDA E FORMA UM CROMÓGENO QUE ABSORVE ABSORVÂNCIA EM 532 nm.
 FONTE: VASCONCELOS *et al.* (2007).

4.6.6.3 CÁLCULO

A concentração das TBARS é expressa em nmoles/g de hemoglobina, de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{TBARS} = \frac{\Delta A}{1,56 \times 10^5 \times [\text{Hb}]}$$

Onde:

ΔA – Diferença dos valores de A em 532 e 600 nm

$1,56 \times 10^5 \times l$ / mmoles / cm - coeficiente de extinção molar

[Hb] - concentração de hemoglobina da suspensão em g/l.

4.6.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA METAHEMOGLOBINA

4.6.7.1 PRINCÍPIO DO MÉTODO

O método proposto por Naoum *et al.*(2004), fundamenta-se nas absorbâncias específicas das moléculas de oxi-Hb e meta-Hb naturalmente presentes nos eritrócitos, estabilizadas em solução tamponada de baixa molaridade e com pH 6,8, similar ao ponto isoelétrico da Hb.

4.6.7.2 TÉCNICA

Suspensões de eritrócitos a 10% foram separadas em alíquotas de 250 µl em microtubos *Eppendorf* e homogeneizadas por 5 minutos com posterior centrifugação de 5 minutos a 1200 x g. Após a centrifugação, retirou-se 50 µl do sobrenadante adicionando-se o mesmo volume (50 µl) das soluções de flavonoides a serem testadas. Esta suspensão foi incubada a temperatura ambiente por 1 hora, sob constante agitação em homogeneizador de tubos, marca Phoenix, modelo AP-22. O *t*-BHP foi adicionado a suspensão após esta etapa, na concentração final de 1 mmol/l; sob constante agitação, à temperatura ambiente por 15 minutos. Analisou-se amostras sem tratamento como controle.

Após as etapas de incubação, preparou-se o hemolisado. Em um tubo identificado como **A**, adicionou-se 100 µl de suspensão de eritrócitos a 10% a 100 µl de saponina 1%. Agitou-se para provocar hemólise. A seguir, adicionou-se 1 ml de tampão fosfato 60 mmoles/l, pH 6,8. Homogeneizou-se a solução por inversão. Em um tubo **B**, adicionou-se 100 µl da solução **A** a 1 ml do tampão fosfato. Homogeneizou-se por inversão e realizou-se a leitura da absorbância do tubo **A** a 630 nm e do tubo **B** a 540 nm, utilizando o tampão fosfato como branco (espectrofotômetro CINTRA 10).

4.6.7.3 CÁLCULO

Expressa-se a concentração de metahemoglobina como porcentagem em relação à concentração total de hemoglobina, de acordo com a fórmula abaixo:

$$\% \text{ MetaHb} = \frac{A1 \times 100}{A1 + (A2 \times 10)}$$

Onde:

A1 - absorbância a 630nm

A2 - absorbância a 540nm

O coeficiente 10 se deve à diluição realizada no tubo **B** (100µl do tubo **A** para 1000µl do tampão fosfato), para obter sensibilidade técnica na leitura espectrofotométrica da oxihemoglobina em 540 nm (NAOUM; RADISPEL; MORAES, 2004).

Os valores de referência para adultos normais para essa técnica são de 1,92 a 3,88 % de meta-Hb.

4.6.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA

4.6.8.1 PRINCÍPIO DO MÉTODO

O método se baseia no desenvolvimento de cor amarela ao se adicionar ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico)(DTNB), conhecido como reagente de Ellman, a compostos de sulfidril. DTNB e GSH reagem formando o ácido 2-nitro-5-benzóico e GSSG (Figura 23).

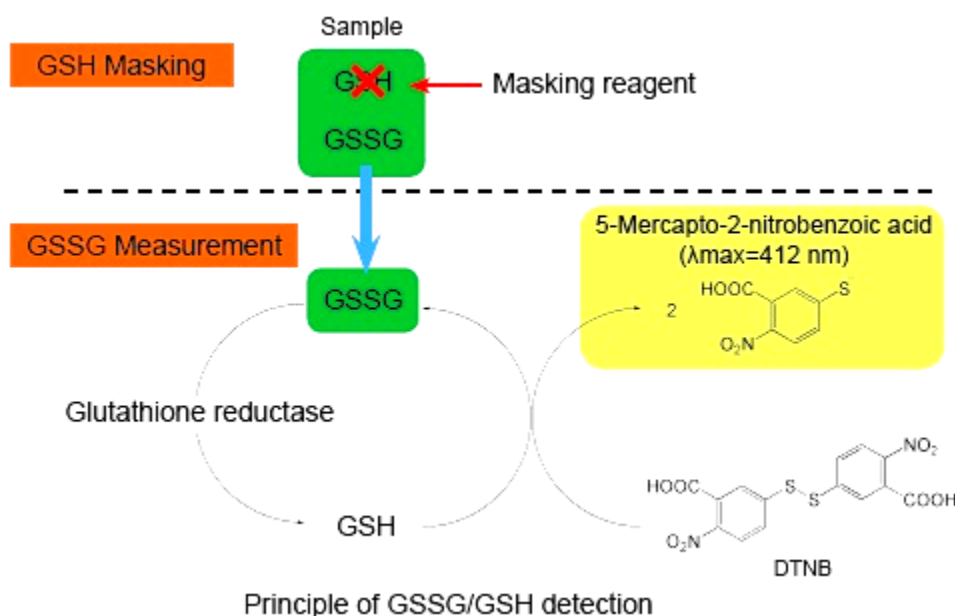


FIGURA 23 – REAÇÃO ENTRE O DNTB E A GSH.FONTE: DOJINDO (2009)

Disponível em <http://www.dojindo.com>

4.6.8.2 TÉCNICA

A concentração de glutathiona reduzida foi determinada pelo método de Beutler (1984), modificado. Suspensões de eritrócitos a 40% foram separadas em alíquotas de 250 μL em microtubos *Eppendorf* e centrifugadas por 5 minutos a 1200 x g. Após a centrifugação, 50 μL do sobrenadante foram retirados, adicionando-se o mesmo volume das soluções de flavonoides, para concentração final de 100 mmoles/l. As suspensões de eritrócitos foram incubadas com os flavonoides por 1 hora a temperatura ambiente, sob constante agitação, em homogeneizador de tubos, marca Phoenix, modelo AP-22.

Após a incubação com os flavonoides, adicionou-se a suspensão de eritrócitos, solução de *t*-BHP 1 mmol/l, incubando-se a temperatura ambiente por 15 minutos, sob homogeneização. Analisou-se amostras sem tratamento como controle.

Adicionou-se 50 μL de suspensão de eritrócitos a 40%, previamente incubadas com os flavonoides e com o agente oxidante (*t*-BHP), a 500 μL de água deionizada, deixando-se a temperatura ambiente por 5 minutos para completar a

hemólise. Em seguida, adicionou-se 750 µl de solução precipitante (ácido metafosfórico 1,67g, EDTA dissódico 0,2 g, NaCl 30 g; q.s.p. 100 ml), homogeneizando-se e deixando em repouso por 5 minutos. Substituindo-se a filtração em papel quantitativo da técnica original, após a homogeneização as amostras foram centrifugadas a 1500 x g por 5 minutos. Adicionou-se 500 µl do sobrenadante límpido a 2,0 ml de solução recente de Na₂HPO₄ 300 mmoles/l. Leu-se a absorbâncias a 412 nm, adicionou-se 250 µl do reagente DTNB (DTNB 200 mg/L em tampão citrato dissódico 10 g/l pH 8,0) e agitou-se por inversão. A cor desenvolve-se rapidamente e permanece estável por 10 minutos. Procedeu-se nova leitura a 412 nm. O branco foi preparado com salina ou plasma ao invés de sangue total.

4.6.8.3 CÁLCULO

Para a calibração do equipamento, preparou-se uma curva padrão de absorbância contra concentração de GSH (mmoles/l), com diluições a partir de uma solução mãe 1,62 mmoles/l de GSH. Os valores de referência em adultos normais são de $6,57 \pm 1,04$ µmoles/gHb (BEUTLER, 1984).

4.6.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE GLICOSE 6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6-PD)

4.6.9.1 PRINCÍPIO DO MÉTODO

Os eritrócitos dependem principalmente da glicose anaeróbica para suas necessidades energéticas. Um dos principais caminhos é a monofosfato hexose, enzima chave para a G6-PD. Esta catalisa a oxidação da glicose-6-fosfato (G6P) a 6-fosfogluconolactona que, rapidamente, se hidrolisa espontaneamente a 6-fosfogluconato (6PG), com a redução simultânea de NADP a NADPH. Na conversão, o NADPH está envolvido na manutenção da integridade da membrana

do eritrócito. A atividade da enzima é determinada pela taxa de variação da absorbância, em 340 nm, associada à redução do NADP^+ (KORNBERG; HORECKER; KAPLAN, 1955; MAKAREN; HENRY; CANNON, 1974).



Na segunda e consecutiva reação oxidante, onde a G6P é convertida em 6-fosfogluconolactona, com redução de mais uma molécula de NADP a NADPH, a lactona sofre descarboxilação para ribulose 5-fosfato, através de uma reação catalisada por uma lactonase específica, mas que também pode ocorrer espontaneamente. Assim, a reação completa, catalisada pela G6-PD pode ser assim escrita:



A liberação de CO_2 força a reação para a direita, de modo que a via, na prática, não é reversível (LOHR; WALLER, 1974). Os ensaios mais comumente utilizados para determinação da atividade da G6-PD medem a taxa de redução do NADP a NADPH quando um hemolisado é incubado com G6P (BEUTLER; DURON; KELLY, 1963).

4.6.9.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

Para a determinação da atividade enzimática de glicose 6-fosfato desidrogenase, por orientação do protocolo do fabricante (G6-PD Randox®) as amostras de sangue venoso, tanto do grupo controle quanto do grupo de pacientes de anemia falciforme, foram separadas em alíquotas de 200 μl antes do procedimento de lavagem utilizada para as outras técnicas do trabalho. Após este procedimento, as amostras foram incubadas com os flavonoides na concentração de 200 mmoles/l por 1 hora, sob constante agitação. O agente oxidante (*t*-BHP) foi adicionado após esta etapa, por 15 minutos também sob homogeneização. Após as duas incubações, a suspensão de eritrócitos foi lavada com 2000 μl de PBS,

centrifugando-se a 3000 x g durante 10 min, repetindo-se o procedimento por três vezes. Os eritrócitos lavados foram ressuspensos em 500 µl de solução R4 (digitonina 0,2 g/l) e deixados por 15 min à temperatura de 4°C. O hemolisado resultante foi centrifugado novamente a 3000 x g por 10 min. O sobrenadante foi utilizado para dosagem no equipamento, que utiliza 15 µl do hemolisado e adiciona 1000 µl da solução R1 (EDTA 3,2 mmoles/l e trietanolamina 31,7 mmoles/l, pH 7,6) e 30 µl da solução R2 (NADP 0,34 mmoles/l). Depois de misturada, a solução foi incubada por 5 min a 37°C e foram adicionados 15 µl da solução R3 (substrato glicose 6-fosfato 0,58 mmoles/l). A leitura foi realizada pelo equipamento em 340 nm. As dosagens foram realizadas em duplicata. Os volumes de pipetagem de reagentes e amostras estão disponíveis na programação fornecida pela Randox, especificamente para o analisador Cobas Mira.

4.6.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS OBTIDOS

Os dados resultantes dos experimentos foram submetidos à análise estatística de variância (ANOVA inteiramente casualizada e fatorial), seguida do teste de Tukey para comparação de pares de médias. A significância estatística foi considerada para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DO “CLUSTER” DO GENE BETA

Para a amplificação dos produtos de PCR necessários para a caracterização dos haplótipos foram utilizados pares de oligonucleotídeos iniciadores para gerar amplicons de tamanhos compatíveis com a sensibilidade da PCR. Dessa forma, foram gerados 8 amplicons, de cada parte específica do gene beta, denominados de acordo com a sua posição no gene. As regiões pesquisadas foram: Hind III: na região IVS 2 do gene gama adenina; Hind III: na região IVS2 do gene gama guanina; Hinc II: no pseudogene; Hinc II: na extremidade 3' do gene beta; Hinf I: na extremidade 5' do gene beta; Taq I: na região entre os genes gama adenina e guanina; XmnI: na região entre o gene embrionário ϵ e o gene gama guanina.

Para todos estes amplicons, foi realizada a pesquisa da melhor temperatura de anelamento, ou seja, temperatura de *melting*. As temperaturas para cada amplicon estão descritas no Quadro 7 (vide Material e Métodos). A Figura 24 ilustra uma corrida eletroforética que busca determinar a melhor temperatura de *melting* de um amplicon na região IVS2 do gene gama guanina, que tem produto (amplicon) de 761 pares de base.

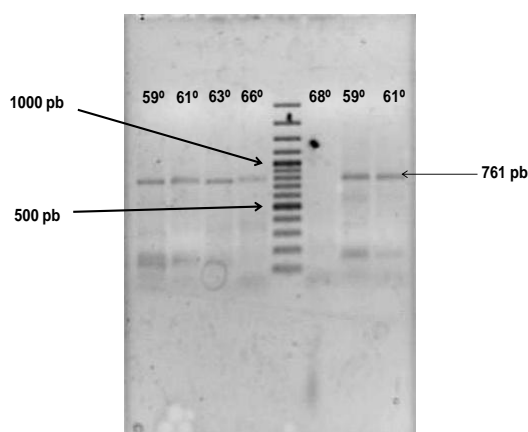


FIGURA 24 - PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DO PRODUTO DE PCR DA REGIÃO IVS2 DO GENE GAMA ALANINA. O PRODUTO (AMPLICON) CONTÉM 761 PARES DE BASE, EM GEL DE AGAROSE 1,5% EM TAMPÃO TBE 1X.
NOTA: PCR realizada para determinação da melhor temperatura de anelamento. Foram testadas temperaturas entre 59 e 68°C.

A Figura 25 ilustra os amplicons de algumas regiões do gene beta. As regiões do gene amplificadas são: pseudogene ϵ , com 760 pares de base; entre o gene embrionário ϵ e gene gama guanina, com 655 pares de base; na região IVS 2 do gene gama adenina, com 328 pares de base e na região entre os genes gama adenina e guanina, com 960 pares de base.

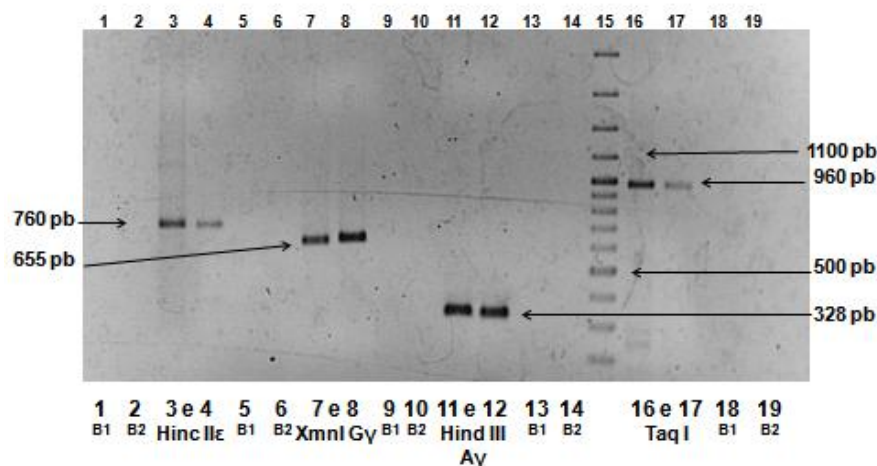


FIGURA 25 - PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DO PRODUTO DE PCR DAS REGIÕES DO PSEUDOGENE ϵ (760 pb), ENTRE O GENE EMBRIONÁRIO ϵ E O GENE GAMA GUANINA (655 pb), NO GENE GAMA ADENINA (328 pb) E ENTRE OS GENES GAMA GUANINA E GAMA ADENINA (960 pb) EM GEL DE AGAROSE 1,5% EM TAMPÃO TBE 1X.

NOTA: As colunas B1 e B2 representam os controles da reação, na ausência de DNA. As colunas 3,4,7,8,11,12,16 e 17 são amostras de DNA amplificadas. Entre as colunas 14 e 16 está o marcador de massa molecular (Generuller Express DNA Ladder, Fermentas).

Na Figura 26, estão demonstrados os amplicons da extremidade 5' do gene embrionário (794 pares de base); da extremidade 3' do gene embrionário (620 pares de base) e da extremidade 5' do gene beta (638 pares de base).

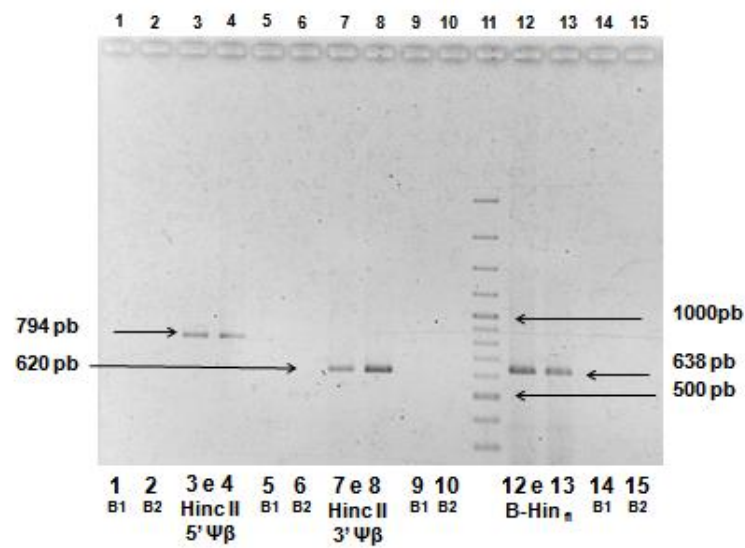


FIGURA 26 - PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DO PRODUTO DE PCR DA EXTREMIDADE 5' DO GENE $\Psi\beta$ (794 pb), DA EXTREMIDADE 3' DO GENE $\Psi\beta$ (620 pb), E NA EXTREMIDADE 5' DO GENE BETA (638 pb), EM GEL DE AGAROSE 1,5% EM TAMPÃO TBE 1X.

NOTA: As colunas B1 e B2 representam os controles da reação. As colunas B1 e B2 representam os controles da reação, na ausência de DNA. As colunas 3,4,7,8,12 e 13 são amostras de DNA amplificadas. Entre as colunas 10 e 12 está o marcador de massa molecular (Generuller Express DNA Ladder, Fermentas).

Para a análise dos sítios de restrição foram utilizadas enzimas específicas para cada região do gene beta. A Figura 27 ilustra a ação das enzimas TaqI, Hinc II $5'\beta\Psi$, Hinc II $3'\beta\Psi$ e β -Hinf I.

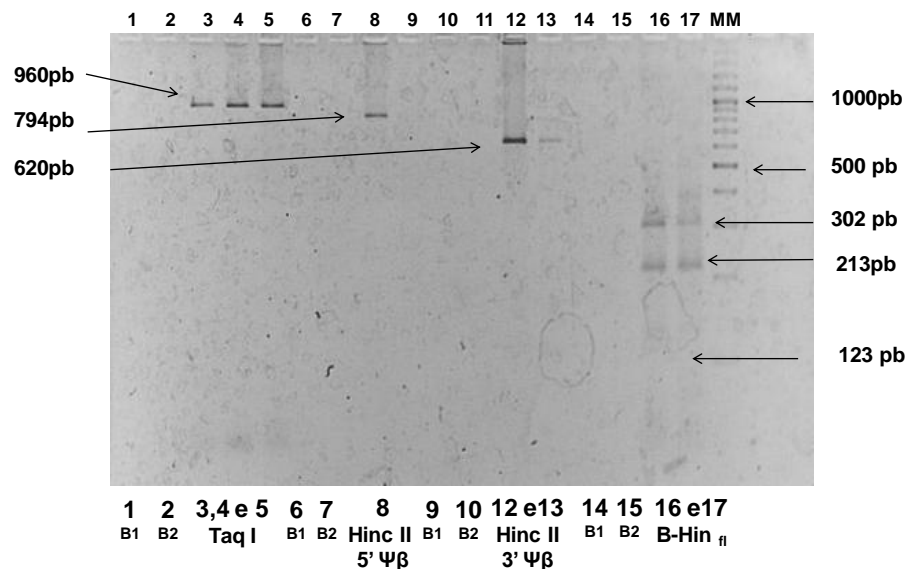


FIGURA 27 – PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO, EM GEL DE AGAROSE 3,5% EM TAMPÃO TBE 1X.

NOTA: As colunas B1 e B2 representam os controles da reação, na ausência de DNA. As linhas 3, 4 e 5 são amostras onde não foi encontrado o sítio de restrição pela enzima TaqI. A linha 8 também ilustra a falta do sítio de restrição para a enzima HincII 5'Ψβ. As linhas 12 e 13 ilustram a ação da enzima Hinc II 3' Ψβ, sem o sítio de restrição. As colunas 16 e 17 demonstram o corte da banda original com 638 pares de base pela enzima β-Hinfl, produzindo três bandas de 302, 213 e 123 pares de bases. Após a coluna 17 está o marcador de massa molecular (Generuller Express DNA Ladder, Fermentas).

Para algumas regiões, as bandas de menor tamanho apresentaram pouca resolução no gel de agarose a 3,5%. Nestas situações, para a confirmação destas bandas de baixo peso molecular, foi realizada corrida eletroforética em gel de poliacrilamida a 10%. As Figuras 28 e 29 ilustram o comportamento da enzima Hind III, na região IVS 2 do gene gama adenina, com 328 pares de base, demonstrando a presença dos sítios de restrição nesta região em algumas amostras, confirmando a presença ou não destas bandas.

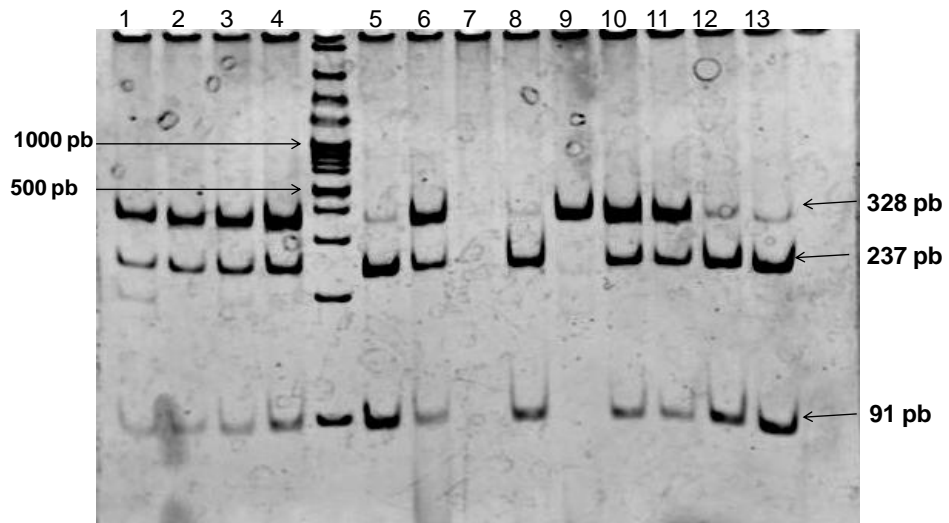


FIGURA 28 - PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO, EM GEL DE POLIACRILAMIDA a 10% EM TAMPÃO TBE 1X.

NOTA: As colunas 1,2,3,4,6,10,11 são amostras onde foi encontrado o fragmento de restrição pela enzima Hind III $G\gamma$, porém com preservação da banda original (328pb), indicando pacientes heterozigotos. As colunas 5,12 e 13 indicam a presença do sítio de restrição sem a preservação da banda original. A banda 9 indica a falta do sítio de restrição. Entre a coluna 4 e 5 está o marcador de massa molecular (Generuller Express DNA Ladder, Fermentas).

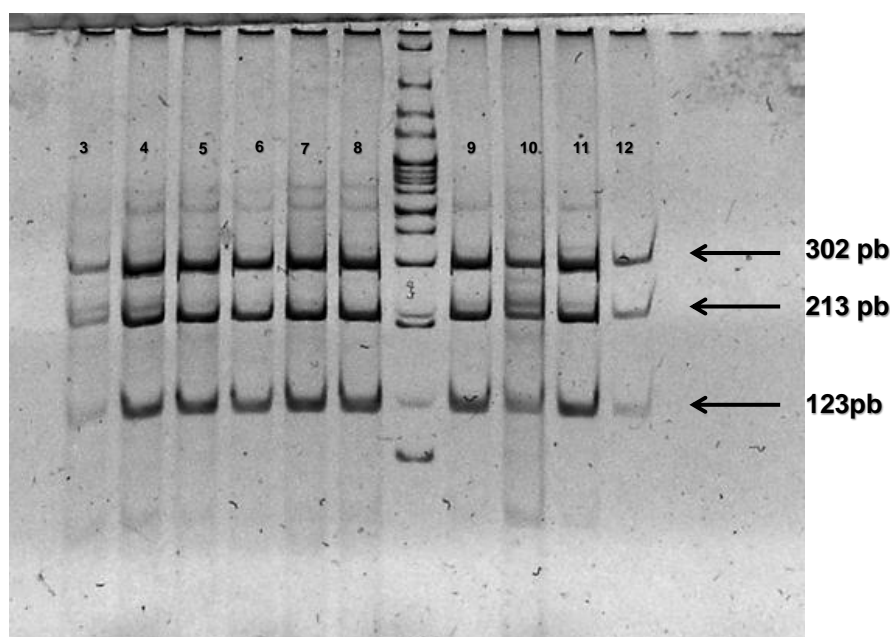


FIGURA 29 - PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO, EM GEL DE POLIACRILAMIDA a 10% EM TAMPÃO TBE 1X.

NOTA: Todas as colunas representam a presença do sítio de restrição para a enzima β -Hinf I. O fragmento original (638 pb) apresenta sítios de restrição no tamanho de 123, 213 e 302 pb, o que é verificado em todas as amostras testadas no gel acima. Entre as colunas 8 e 9 está o marcador de massa molecular (Generuller Express DNA Ladder, Fermentas).

A Figura 30 demonstra o comportamento da enzima Taq I, na região entre os genes gama guanina e gama adenina com 960 pares de base. A presença do sítio de restrição implica no aparecimento de bandas de 753 e 207 pares de base, demonstrando a presença dos sítios de restrição nesta região em algumas amostras.

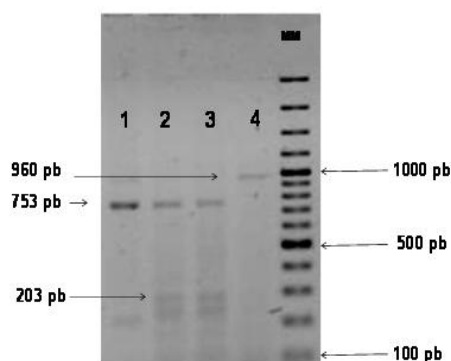


FIGURA 30 - PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO EM GEL DE AGAROSE A 3,5% EM TAMPÃO TBE 1X.

NOTA: As colunas 1, 2 e 3 apresentam o sítio de restrição para a enzima TaqI, apresentando bandas de 753 e 207 pb. A coluna 4 demonstra uma amostra que não apresenta o sítio de restrição (960 pb). Após a coluna 4 está o marcador de massa molecular (Generuller Express DNA Ladder, Fermentas).

As Figuras 31, 32 e 33 demonstram o comportamento da enzima XmnI, na região entre o gene embrionário ϵ e gene gama guanina; da enzima Hinc II nas regiões 3' e 5' do gene embrionário $\Psi\beta$.

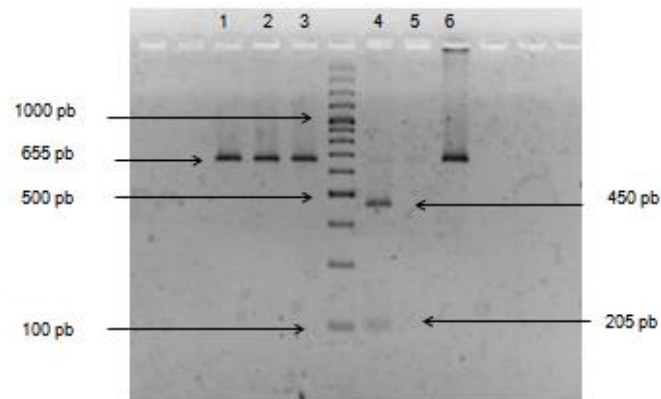


FIGURA 31 - PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO EM GEL DE POLIACRILAMIDA a 10% EM TAMPÃO TBE 1X.

NOTA: As colunas 1, 2, 3 e 6 demonstram falta do sítio de restrição XmnI, na região entre o gene embrionário ϵ e gene gama guanina. A coluna 4 demonstra este sítio de restrição. Entre as colunas 3 e 4 está o marcador de massa molecular (Generuller Express DNA Ladder, Fermentas).

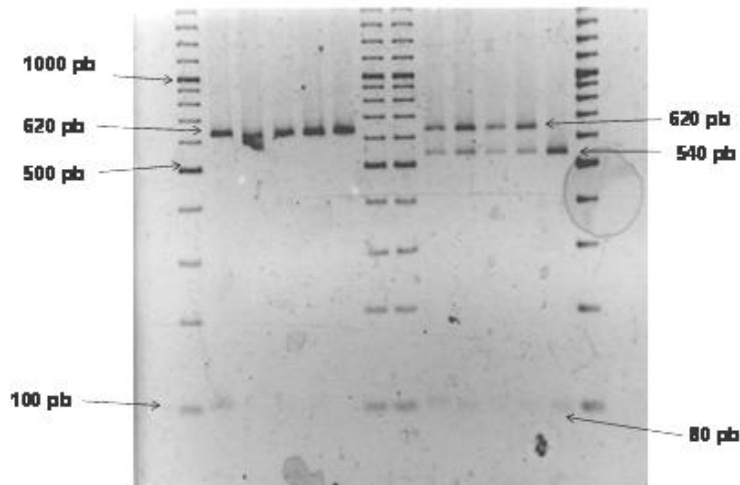


FIGURA 32 - PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO EM GEL DE AGAROSE A 3,5% EM TAMPÃO TBE 1X.

NOTA: As cinco primeiras colunas demonstram o amplicon original sem a ação da enzima de restrição (produto de PCR). Após as duas colunas com o marcador de massa (Generuller Express DNA Ladder, Fermentas), as cinco colunas demonstram o amplicon original mas com a presença do sítio de restrição Hinc II 3' $\Psi\beta$. A última coluna apresenta apenas o perfil eletroforético da presença do sítio de restrição.

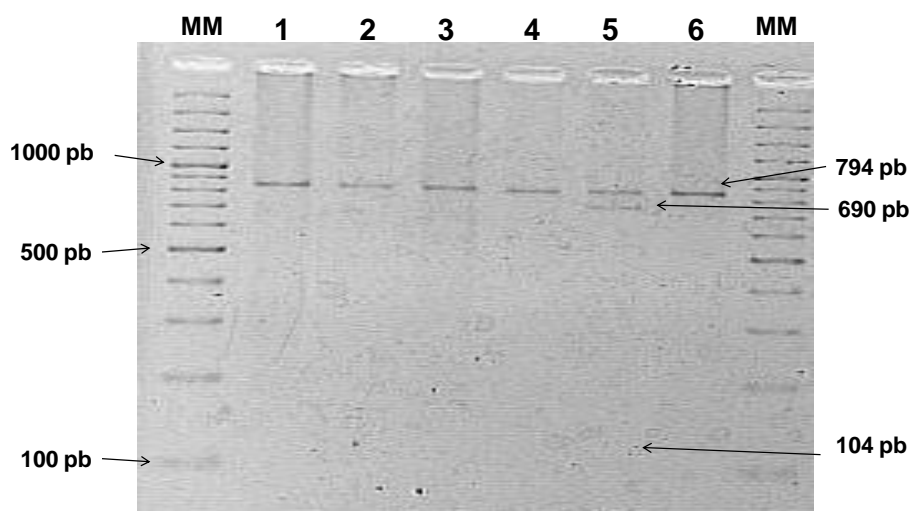


FIGURA 33 - PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO EM GEL DE AGAROSE A 3,5% EM TAMPÃO TBE 1X.

NOTA: A coluna 05 demonstra a presença de sítio de restrição Hinc II 5' $\Psi\beta$, com a banda original 794 pb, mais o sítio de restrição previsto, com 690 pb (visível) e 104 pb (não visível). As demais colunas demonstram a falta do sítio de restrição. No início e no final do gel está o marcador de massa molecular (Generuller Express DNA Ladder, Fermentas), denominado linha MM.

O Quadro 10 demonstra como classificar os polimorfismos do gene beta (haplótipos da anemia falciforme) de acordo com a presença ou não dos sítios específicos de restrição.

QUADRO 10 - PRINCIPAIS HAPLÓTIPOS DO COMPLEXO DO GENE B^S DEFINIDOS PELA AÇÃO DE 8 ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.

	Hinc II ϵ	Xmn I $G\gamma$	Hind III $G\gamma$	Taq I	Hind III $A\gamma$	Hinc II 5' $\beta\Psi$	Hinc II 3' $\beta\Psi$	β - Hinfl
SEN	+	+	+	+	-	+	+	+
BEN	-	-	-	-	-	-	+	+
BAN	-	-	+	+	-	-	+	+
SAUDITA	+	+	+	+	-	+	+	-
CAMARÕES	-	-	+	+	+	-	+	-

NOTA: (+) = presença de sítio de restrição; (-) = ausência de sítio de restrição.

FONTE: MURALITHARAN, *et al* (2003).

As Figuras 34 a 41 ilustram como foram classificados os pacientes de acordo com o comportamento das várias enzimas de restrição.

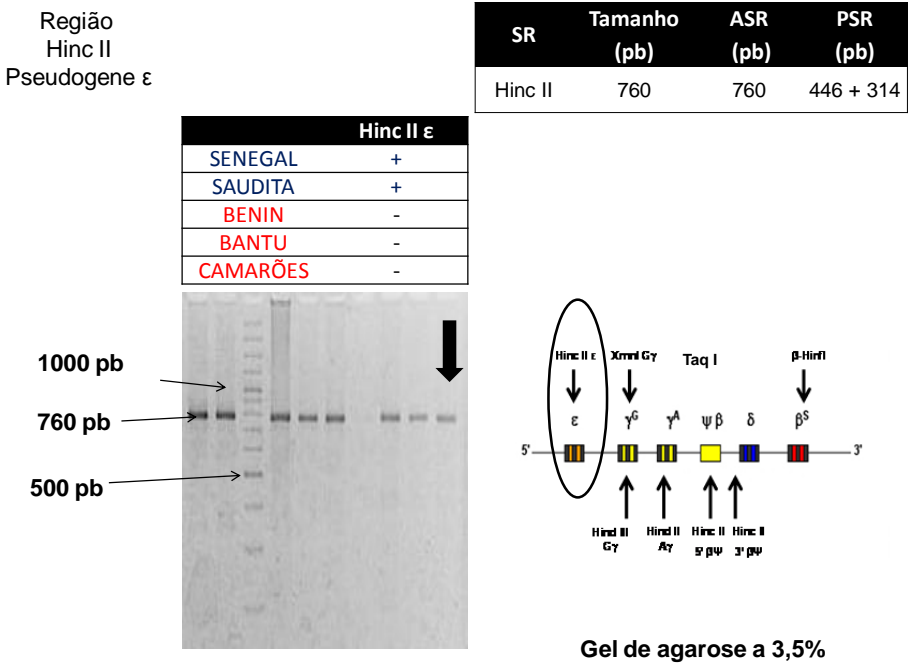


FIGURA 34 – PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO EM GEL DE AGAROSE A 3,5% EM TAMPÃO TBE 1X.
NOTA: Região pesquisada: Pseudogene ε. Enzima utilizada: Hinc II
Paciente SETA: Não apresenta sítio de restrição nesta região.
Possibilidades: Haplótipo BEN, BAN e Camarões.

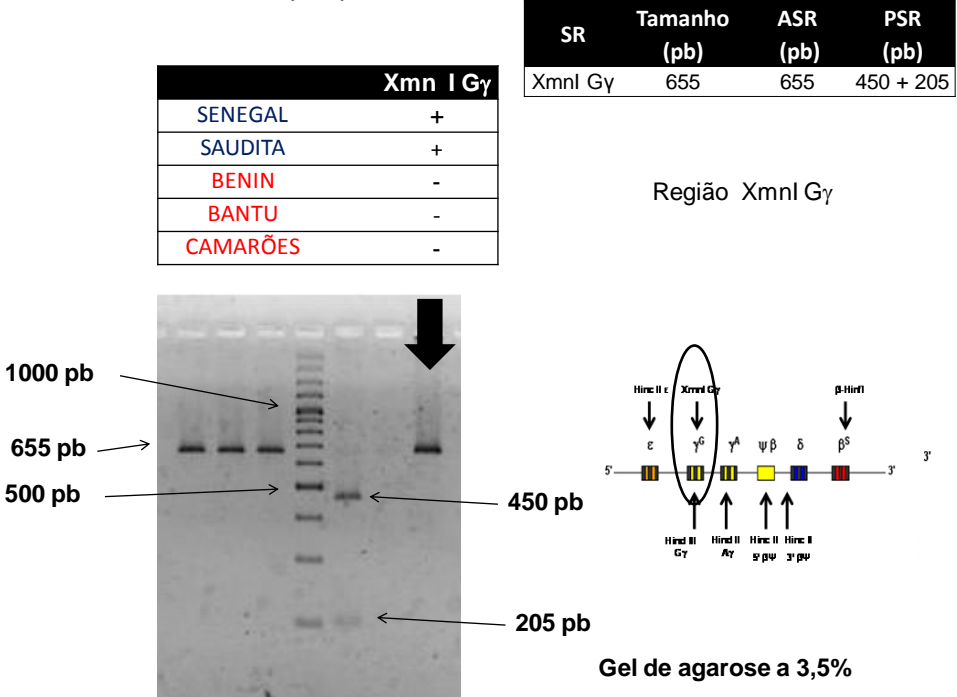


FIGURA 35 – PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO EM GEL DE AGAROSE A 3,5% EM TAMPÃO TBE 1X.
NOTA: Região pesquisada: Entre o gene embrinário ε e o gene gama guanina.
Enzima utilizada: XmnI
Paciente SETA: Não apresenta sítio de restrição nesta região.
Possibilidades: Haplótipos BEN, BAN e Camarões.

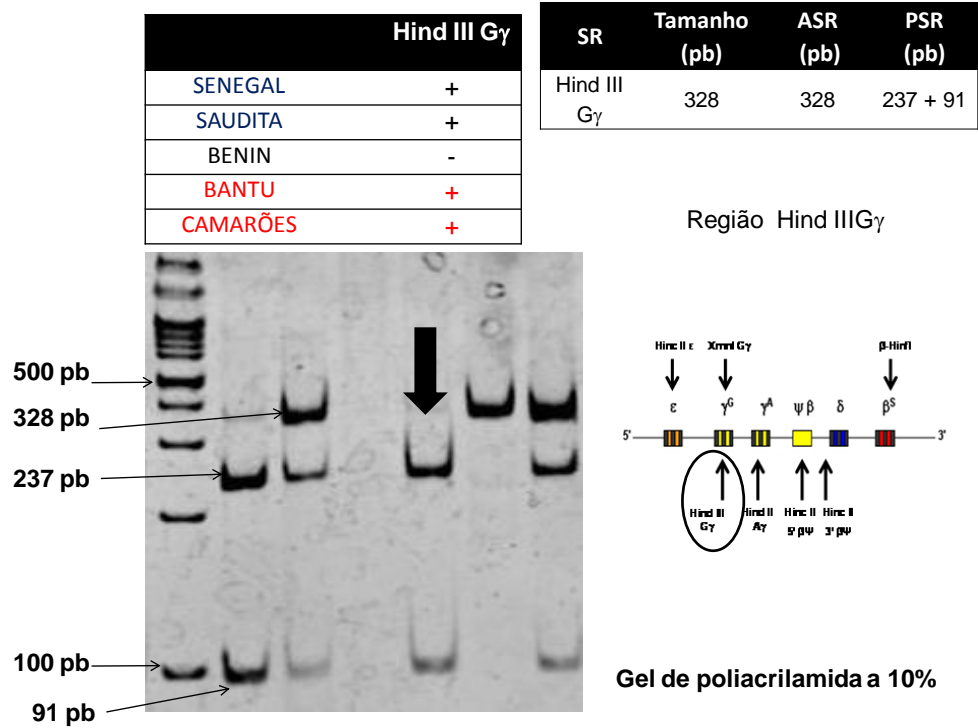


FIGURA 36 – PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 10% EM TAMPÃO TBE 1X.
NOTA: Região pesquisada: IVS 2 do gene Gama Guanina. Enzima utilizada: Hind III
Paciente SETA: Apresenta sítio de restrição nesta região.
Possibilidades: Haplótipo SEN, Árabe-Indio, BAN e Camarões.

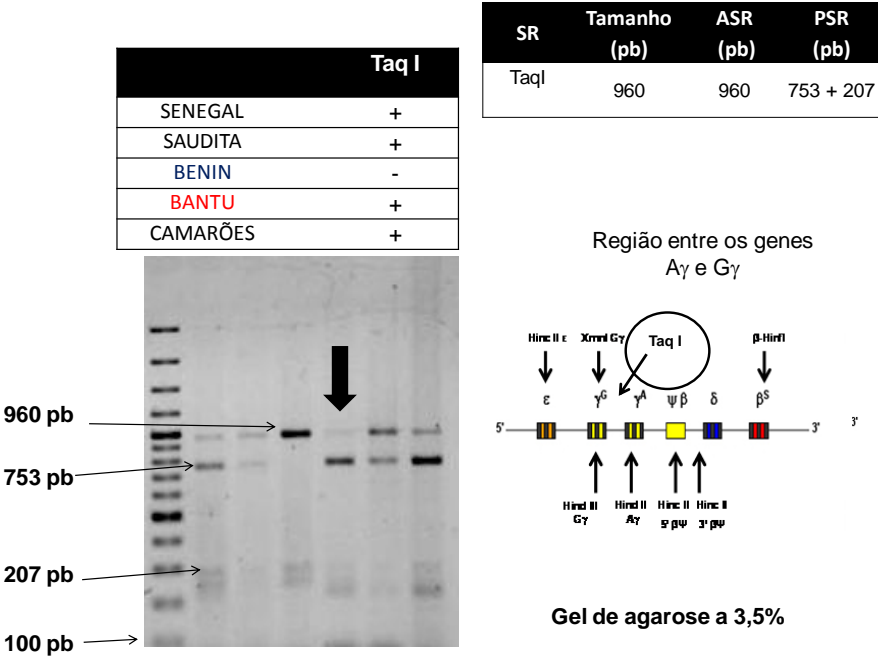


FIGURA 37 – PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO EM GEL DE AGAROSE A 3,5% EM TAMPÃO TBE 1X.
NOTA: Região pesquisada: Entre os genes Gama Guanina e Gama Adenina. Enzima utilizada: Taq I.
Paciente SETA: Apresenta sítio de restrição nesta região.
Possibilidades: Haplótipo SEN, Árabe-Índio, BAN e Camarões.

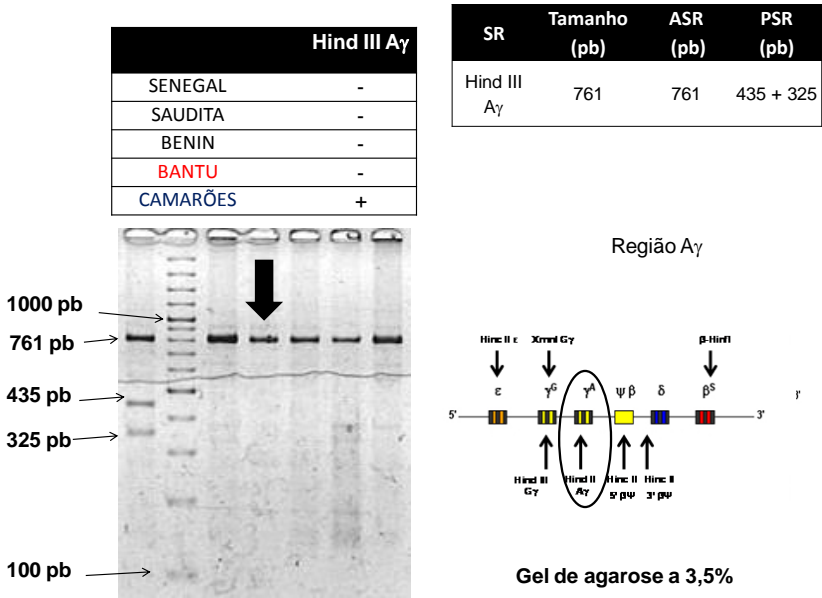


FIGURA 38 – PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO EM GEL DE AGAROSE A 3,5% EM TAMPÃO TBE 1X.
NOTA: Região pesquisada: IVS2 do gene Gama Adenina.
Enzima utilizada: Hind III.
Paciente SETA: Não apresenta sítio de restrição nesta região.
Possibilidades: Haplótipo SEN, Árabe-Índio, BEN e BAN.

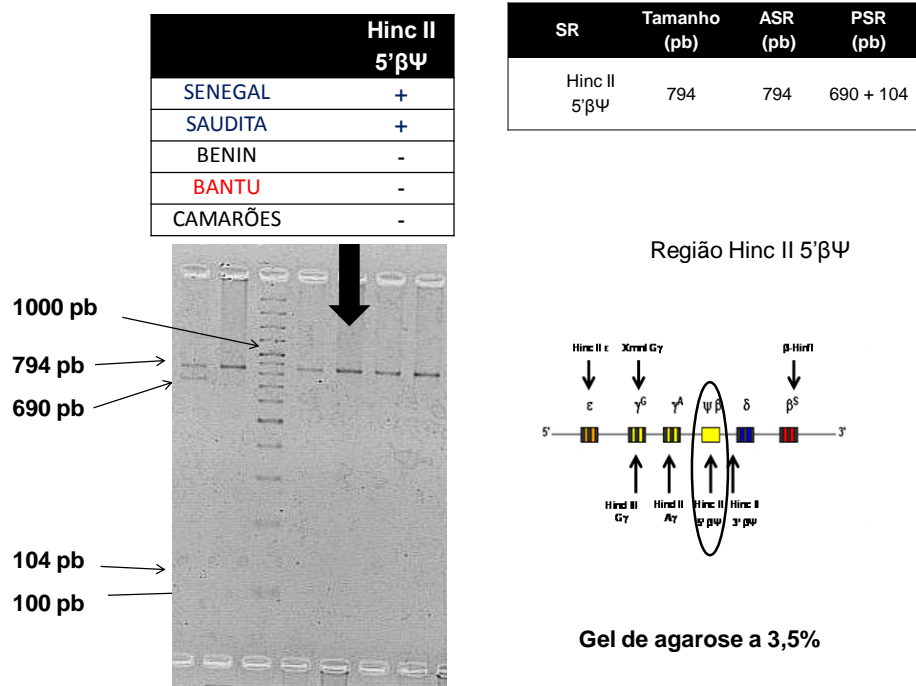


FIGURA 39 – PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO EM GEL DE AGAROSE A 3,5% EM TAMPÃO TBE 1X.
 NOTA: Região pesquisada: Extremidade 5' do gene embrionário Ψβ.
 Enzima utilizada: Hinc II.
 Paciente SETA: Não apresenta sítio de restrição nesta região.
 Possibilidades: Haplótipos BEN, BAN e Camarões.

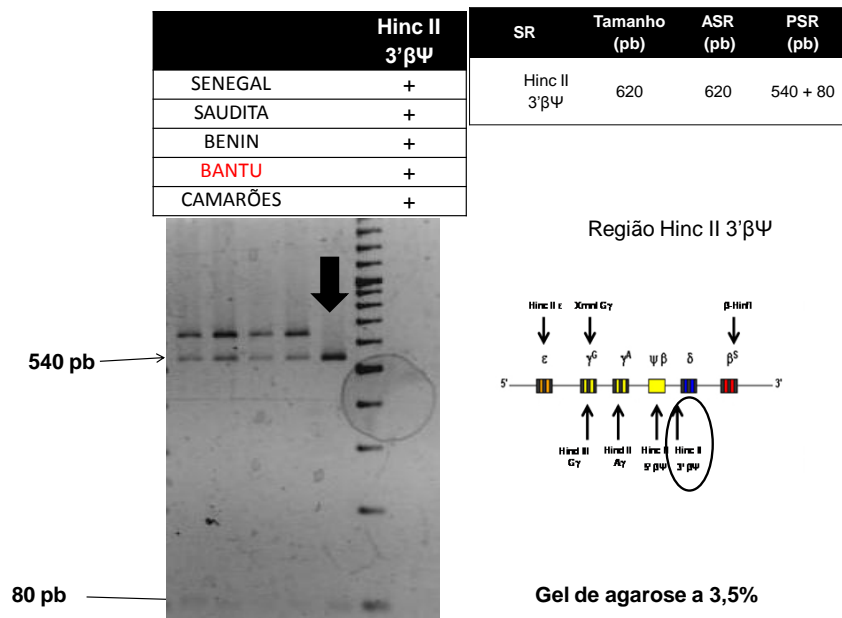


FIGURA 40 – PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO EM GEL DE AGAROSE A 3,5% EM TAMPÃO TBE 1X.
 NOTA: Região pesquisada: Extremidade 3' do gene embrionário Ψβ.
 Enzima utilizada: Hinc II.
 Paciente SETA: Não apresenta sítio de restrição nesta região.
 Possibilidades: Haplótipos SEN, Árabe-Índio, BEN, BAN e Camarões.

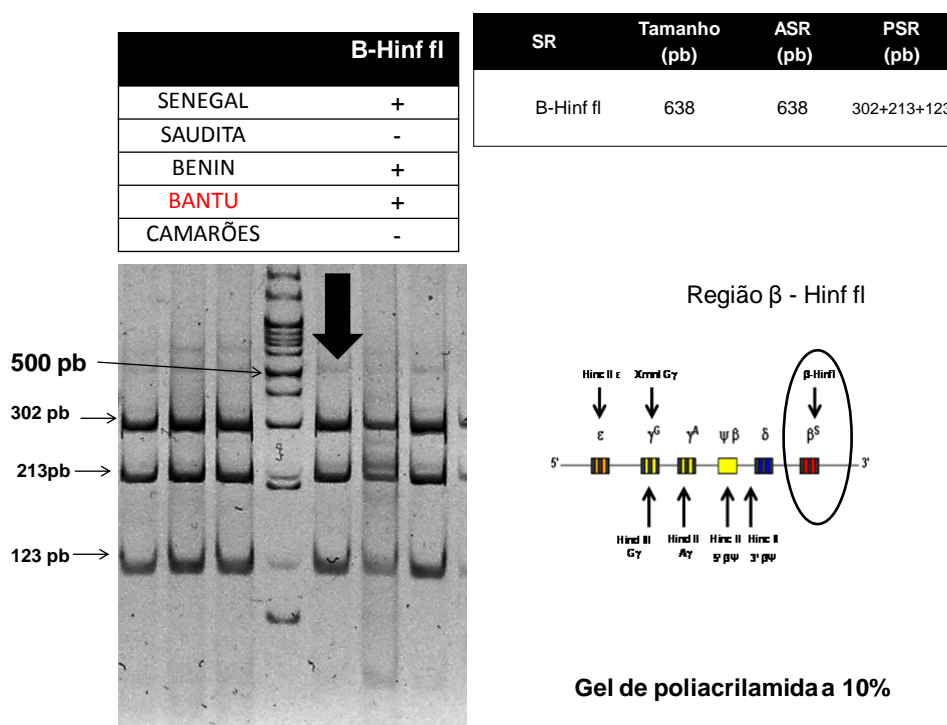


FIGURA 41 – PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA ANÁLISE DA PRESENÇA DE SÍTIOS DE RESTRIÇÃO EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 10% EM TAMPÃO TBE 1X.

NOTA: Região pesquisada: Extremidade 5' do gene beta.

Enzima utilizada: Hinf fl.

Paciente SETA: Não apresenta sítio de restrição nesta região.

Possibilidades: Haplótipos SEN, BEN e BAN.

Observando o padrão da presença dos sítios de restrição no paciente indicado pela seta preta (PACIENTE SETA), observa-se que o haplótipo BAN foi compatível em todas as enzimas de restrição testadas, desta forma, classificamos este suposto paciente como homozigoto para o haplótipo BAN (BAN/BAN).

A análise de 29 pacientes permitiu o estudo de 58 cromossomos. Foram encontrados 41 cromossomos com haplótipo BAN (70,8%), 15 cromossomos BEN (25,8%) e 2 cromossomos SEN (3,4%). Destes, 11 pacientes foram heterozigotos para os haplótipos BAN e BEN (BAN/BEN)(38,0%), 15 foram homozigotos para o haplótipo BAN (BAN/BAN)(51,7%), 2 foram homozigotos para o haplótipo BEN (BEN/BEN)(6,9%) e 1 paciente portador em homozigose para o haplótipo SEN (SEN/SEN)(3,4%).

5.2 HEMOGRAMA

Determinou-se os parâmetros hematimétricos dos pacientes do grupo controle (AA) e do grupo de pacientes de anemia falciforme (SS). Os valores médios, desvios e erros padrão e os intervalos de confiança estão descritos na Tabela 1. O grupo controle apresentou médias semelhantes aos valores de normalidade para o eritrograma descritos na literatura para populações adultas (VALDATI; HENNEBERG; DO NASCIMENTO, 2011). O grupo SS apresentou contagem de eritrócitos, dosagem da hemoglobina e determinação do hematócrito baixas, com elevação tanto do volume corpuscular médio (VCM) quanto da contagem de plaquetas. As médias encontradas no grupo SS são condizentes com outros estudos sobre pacientes com anemia falciforme em tratamento com hidroxiureia, principalmente com relação ao aumento do VCM.

TABELA 1 - VALORES MÉDIOS, DESVIO E ERRO PADRÃO E LIMITES DE CONFIANÇA DOS PARÂMETROS HEMATIMÉTRICOS OBTIDOS EM GRUPO CONTROLE (AA) E EM GRUPO DE PACIENTES DE ANEMIA FALCIFORME (SS) ATENDIDOS NO HEMEPAR, CURITIBA, PR, 2011-2012.

ANALITO	GRUPO	MÉDIA	DP	EPM	LIM. CONFIANÇA		N	p*
					-95.00%	+95.00%		
RBC	AA	4,91	0,65	0,17	4,55	5,27	15	0,000
	SS	2,67	0,53	0,10	2,46	2,87	29	
HGB	AA	15,36	1,83	0,47	14,34	16,38	15	0,000
	SS	8,82	1,25	0,23	8,34	9,29	29	
HCT	AA	42,60	4,63	1,19	40,04	45,16	15	0,000
	SS	26,51	4,19	0,78	24,92	28,10	29	
VCM	AA	87,15	3,04	0,78	85,47	88,83	15	0,004
	SS	100,89	13,67	2,54	95,69	106,09	29	
HCM	AA	31,26	1,23	0,32	30,58	31,94	15	0,0851**
	SS	33,74	5,35	0,99	31,71	35,78	29	
CHCM	AA	35,69	0,97	0,25	35,16	36,23	15	0,005
	SS	33,37	1,83	0,34	32,67	34,06	29	
PLT	AA	246,20	60,65	15,66	212,61	279,79	15	0,0119
	SS	458,93	211,89	39,35	378,33	539,53	29	

NOTA: * - Anova entre os grupos AA e SS; ** - Sem significância estatística ($p > 0,05$).

RBC= eritrócitos; HGB= hemoglobina; HCT= hematócrito; VCM= volume corpuscular médio; HCM= Hemoglobina corpuscular média; CHCM= concentração da hemoglobina corpuscular média; PLT= plaquetas.

As Figuras 42 e 43 ilustram o comportamento dos parâmetros hematológicos estratificando o grupo SS em seus haplótipos. O padrão das diferenças entre o grupo controle e os subgrupos SS (haplótipos) apresentaram o mesmo

comportamento quanto da comparação com o grupo SS, sem a estratificação em seus haplótipos.

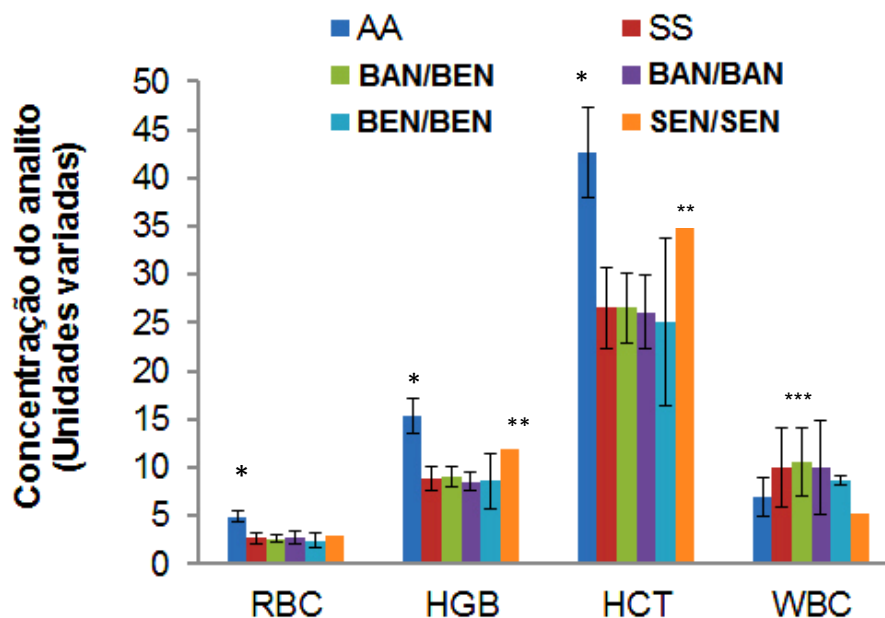


FIGURA 42 -PARÂMETROS HEMATIMÉTRICOS OBTIDOS EM GRUPO CONTROLE (AA) E EM GRUPO DE PACIENTES DE ANEMIA FALCIFORME (SS), ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS, ATENDIDOS NO HEMEPAR, CURITIBA, PR, 2011-2012.

NOTA : *Diferenças estatisticamente significativa entre o grupo AA e os demais grupos
 **Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo AA e o haplótipo SEN.

*** Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

RBC= eritrócitos; HGB= hemoglobina; HCT= hematócrito; WBC = leucócitos

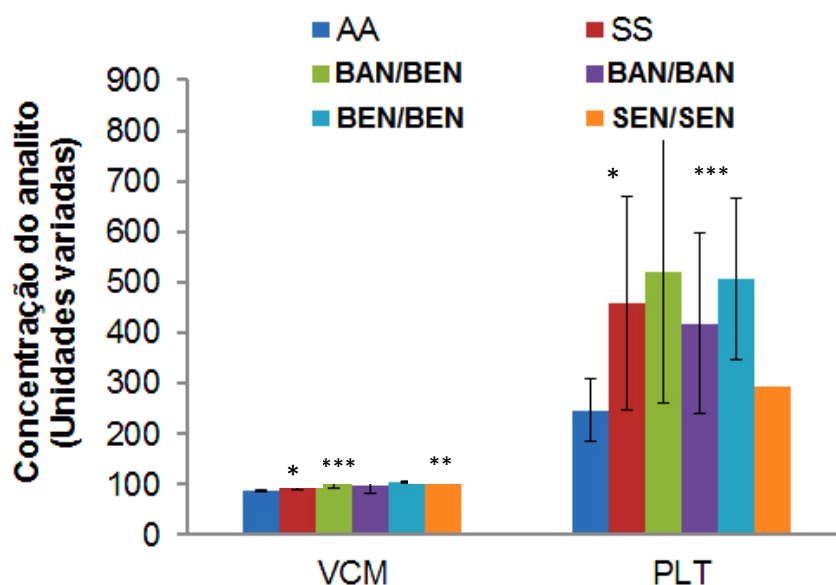


FIGURA 43 - VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO E CONTAGEM DE PLAQUETAS OBTIDOS EM GRUPO CONTROLE (AA) E EM GRUPO DE PACIENTES DE ANEMIA FALCIFORME (SS), ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS, ATENDIDOS NO HEMEPAR, CURITIBA, PR, 2011-2012.

NOTA: *Diferença estatisticamente significativa entre o grupo AA e o grupo SS.

** Diferença estatisticamente significativa entre o grupo AA e os haplótipos BEN/BAN e SEN/SEN.

*** Diferença estatisticamente significativa entre o grupo AA e o haplótipo BEN/BAN.

VCM= volume corpuscular médio; PLT= plaquetas.

5.3 HEMOGLOBINA FETAL

A Tabela 2 demonstra os valores médios, desvios e erros padrão e os limites de confiança encontrados no grupo SS, estratificado de acordo com os haplótipos determinados neste estudo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os resultados obtidos para pacientes com haplótipos BEN/BAN, BAN/BAN e BEN/BEN em relação ao grupo SS. Para o único paciente do haplótipo SEN/SEN, o valor obtido foi o mais elevado entre os pacientes estudados.

TABELA 2 - VALORES MÉDIOS, DESVIO E ERRO PADRÃO E LIMITES DE CONFIANÇA DA DOSAGEM DE HEMOGLOBINA FETAL EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS), DE ACORDO COM OS DIFERENTES HAPLÓTIPOS.

HAPLÓTIPO	N	Média (%)	Desvio Padrão	Erro Padrão	L. Confiança	
					-95,00%	+95,00%
BEN/BAN(n=11)	12	11,2	10,00	2,88	4,86	17,58
BAN/BAN(n=15)	14	9,8	6,42	1,71	6,11	13,53
BEN/BEN(n=2)	2	9,6	0,84	0,60	1,97	17,22
SEN/SEN (n=1)	1	38,6	-	-	-	-

NOTA: Não houve diferença estatística significativa entre os haplótipos BEN/BAN, BAN/BAN, BEN/BEN.

5.4 DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO).

A Tabela 3 mostra a média das unidades de fluorescência por grama de hemoglobina (UF/g Hb), os desvios padrão, os erros padrão e os coeficientes de variação do grupo AA e do grupo SS, dividido em seus haplótipos, no estado basal, ou seja, sem nenhum tratamento, sob ação do *t*-BHP e ação protetora dos flavonoides.

As Figuras 44 a 47 ilustram o comportamento do estado basal, sem nenhum tratamento, do grupo AA e do grupo SS em seus respectivos haplótipos e a ação protetora da quercetina, da rutina, da miricetina e da hesperidina nas concentrações de 30, 50 e 100 μ moles/l. A produção de ERO em nível basal e pela ação oxidante do terc-butil hidroperóxido (75 μ moles/l) não apresentou diferenças estatisticamente significativa entre os grupos.

Todas as concentrações de quercetina, rutina, hesperidina e miricetina estudadas (30, 50 e 100 μ moles/l) demonstraram efeito inibidor na produção de ERO, tanto no grupo AA quanto no grupo SS. Este efeito foi dose-dependente (com exceção da hesperidina), ou seja, quanto maior a concentração do flavonoide testado, maior a inibição da produção das ERO. Nas concentrações de 30 e 50 μ moles/l, a quercetina apresentou, nas médias encontradas, o melhor efeito protetor, enquanto que na maior concentração testada, a rutina apresentou o melhor comportamento antioxidante (Tabela 3). Em todas as concentrações testadas, a hesperidina apresentou o menor poder de sequestramento das ERO, seguida da miricetina. A quercetina e a rutina apresentaram os melhores resultados com médias

muito semelhantes em todas as concentrações testadas. A miricetina apresentou diferenças significativas de proteção entre os haplótipos BEN/BAN e BAN/BAN, nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{moles/l}$, com o grupo BEN/BAN demonstrando maior efeito protetor para este flavonoide.

TABELA 3 – PRODUÇÃO DE ERO EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME, ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS, SUBMETIDOS AO ESTRESSE OXIDATIVO PELO *t*-BHP APÓS AÇÃO DOS FLAVONOIDES.

TRATAMENTO	AA (n=15)	BEN/BAN (n=11)	BAN/BAN (n=15)	BEN/BEN (n=2)	SEN/SEN (n=1)	p
BASAL	120,6 \pm 53,6	98,6 \pm 44,7	104,4 \pm 48,7	73,8 \pm 12,8	66,3 \pm 8,9	NS
<i>t</i> -BHP 75 $\mu\text{moles/l}$	1579,6 \pm 413,6	1482,1 \pm 325,0	1412,6 \pm 417,7	1663,2 \pm 365,3	1248,6 \pm 72,3	NS
QUERCETINA						
30 $\mu\text{moles/l}$	444,9 \pm 465,9	281,7 \pm 318,7	346,5 \pm 408,0	387,5 \pm 299,3	175,1 \pm 60,2	NS
50 $\mu\text{moles/l}$	174,4 \pm 91,6	135,5 \pm 131,6	197,0 \pm 238,0	245,3 \pm 196,1	66,2 \pm 8,2	NS
100 $\mu\text{moles/l}$	105,8 \pm 63,7	90,7 \pm 54,6	174,9 \pm 353,6	98,9 \pm 43,9	55,3 \pm 6,6	NS
RUTINA						
30 $\mu\text{moles/l}$	550,2 \pm 331,2	372,1 \pm 435,9	445,7 \pm 399,1	668,9 \pm 523,0	224,3 \pm 46,3	NS
50 $\mu\text{moles/l}$	227,6 \pm 140,1	192,6 \pm 194,6	267,1 \pm 280,5	447,5 \pm 370,3	91,0 \pm 30,4	NS
100 $\mu\text{moles/l}$	83,5 \pm 49,2	101,0 \pm 48,3	156,1 \pm 285,0	146,6 \pm 55,4	41,1 \pm 6,6	NS
Média \pm DP						
HESPERIDINA						
30 $\mu\text{moles/l}$	1068,3 \pm 469,4	1129,9 \pm 410,5	1072,4 \pm 474,6	1318,1 \pm 382,3	618,2 \pm 119,7	NS
50 $\mu\text{moles/l}$	1083,5 \pm 415,8	1035,7 \pm 404,7	1082,0 \pm 495,6	1371,3 \pm 569,6	693,5 \pm 113,3	NS
100 $\mu\text{moles/l}$	1066,0 \pm 442,0	950,1 \pm 409,4	1082,3 \pm 453,4	1260,2 \pm 419,0	671,9 \pm 153,3	NS
MIRICETINA						
30 $\mu\text{moles/l}$	749,5 \pm 399,9	469,9 \pm 476,9	835,0 \pm 584,0	898,5 \pm 492,4	307,8 \pm 62,8	NS
50 $\mu\text{moles/l}$	400,2 \pm 238,0	225,7 \pm 185,9*	602,1 \pm 524,4*	675,0 \pm 496,8	402,5 \pm 51,8	NS
100 $\mu\text{moles/l}$	192,3 \pm 186,6	124,6 \pm 151,2*	269,2 \pm 338,7*	145,0 \pm 83,8	35,9 \pm 8,9	NS

NOTA: Produção de ERO (UF/gHb) detectadas em suspensões de eritrócitos (hematócrito 10%) de 15 indivíduos normais e 29 pacientes com anemia falciforme, estratificados em seus haplótipos, BEN/BAN (n=11); BAN/BAN(n=15), BEN/BEN(n=2); SEN/SEN(n=1), incubados com concentrações 30, 50 e 100 $\mu\text{moles/l}$ de cada flavonoide por 30 minutos sendo posteriormente submetidos ao estresse oxidativo de 75 $\mu\text{moles/l}$ de *t*-BHP, analisados em quadruplicata após incubação (15 minutos) a 37°C.

NS= não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

*Diferença estatisticamente significativa entre o grupo AA e os haplótipos BEN/BAN e BAN/BAN.

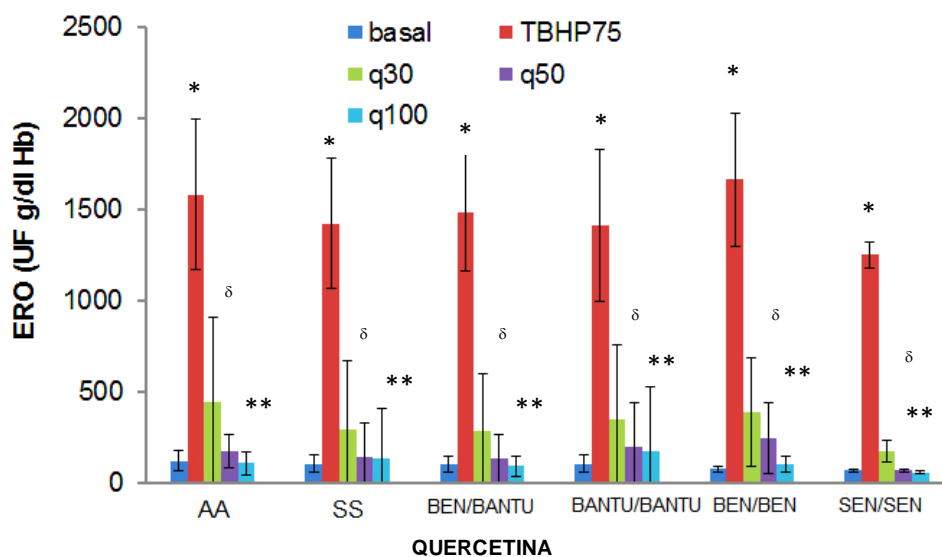


FIGURA 44 - PRODUÇÃO DE ERO EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS SUBMETIDOS À AÇÃO PROTETORA DA QUERCETINA (30,50 e 100 μ moles/l) COM POSTERIOR AÇÃO OXIDANTE DO t-BHP.

NOTA: Produção de ERO (UF/gHb) detectadas em suspensões de eritrócitos de 15 indivíduos normais e 29 pacientes com anemia falciforme, estratificados em seus haplótipos (BEN/BAN (n=11); BAN/BAN (n=15), BEN/BEN (n=2); SEN/SEM (n=1)) submetidos ao estresse oxidativo de 75 μ moles/l de TBHP, analisados em quadruplicata com concentrações de 30, 50 e 100 μ moles/l de quercetina. As barras de erro representam os erros padrões.

*Diferença estatisticamente significativa entre o nível basal e pela ação do t-BHP.

δ Diferença estatisticamente significativa entre a concentração de 30 μ moles/l e o nível basal.

** Não houve diferença estatisticamente significativa entre o nível basal e as concentrações 50 e 100 μ moles/l.

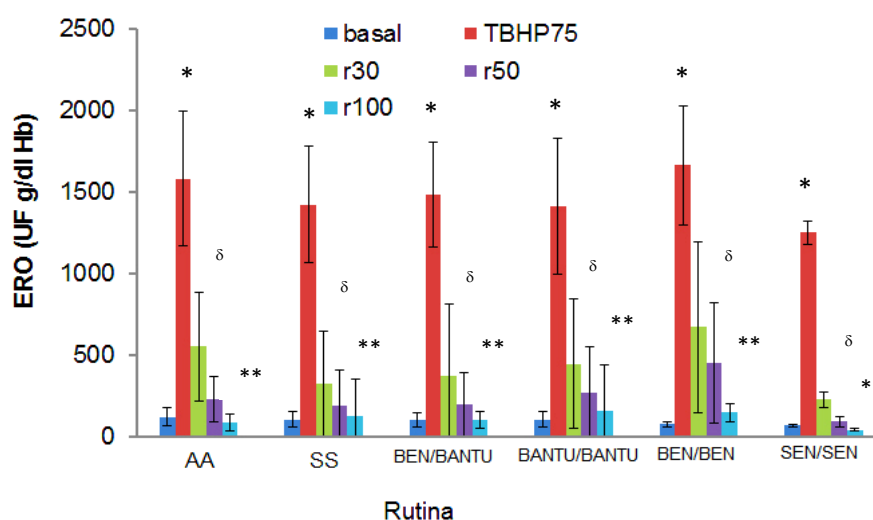


FIGURA 45 - PRODUÇÃO DE ERO EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS SUBMETIDOS AÇÃO PROTETORA DA RUTINA (30,50 e 100 μ moles/l) COM POSTERIOR AÇÃO OXIDANTE DO t-BHP.

NOTA: Produção de ERO (UF/gHb) detectadas em suspensões de eritrócitos de 15 indivíduos normais e 29 pacientes com anemia falciforme, estratificados em seus haplótipos (BEN/BAN (n=11); BAN/BAN(n=15), BEN/BEN (n=2); SEN/SEM (n=1)) submetidos ao estresse oxidativo de 75 μ moles/l de TBHP, analisados em quadruplicata com concentrações de 30, 50 e 100 μ moles/l de rutina. As barras de erro representam os erros padrões.

*Diferença estatisticamente significativa entre o nível basal e pela ação do t-BHP.

^δ Diferença estatisticamente significativa entre a concentração de 30 μ moles/l e o nível basal.

** Não houve diferença estatisticamente significativa entre o nível basal e as concentrações 50 e 100 μ moles/l.

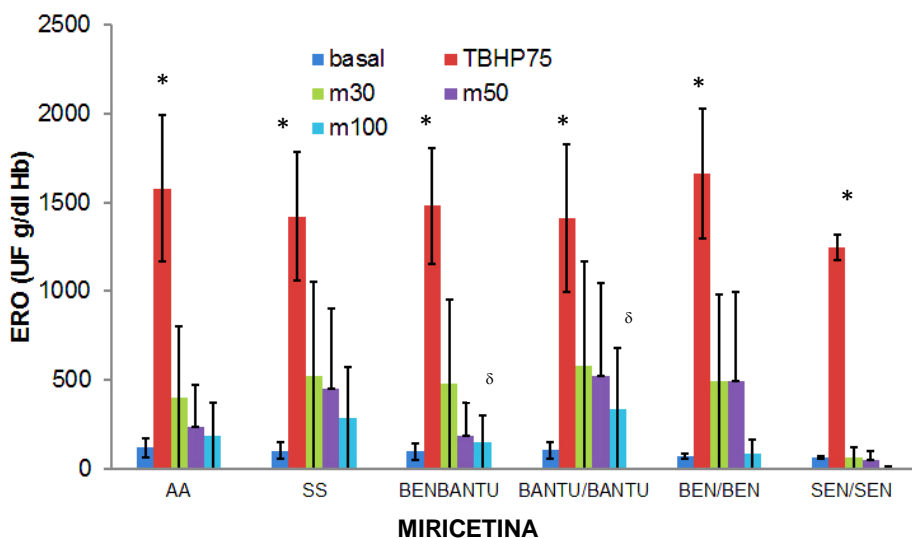


FIGURA 46 - PRODUÇÃO DE ERO EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS SUBMETIDOS AÇÃO PROTETORA DA MIRICETINA (30,50 e 100 μ moles/l) COM POSTERIOR AÇÃO OXIDANTE DO *t*-BHP.

NOTA: Produção de ERO (UF/gHb) detectadas em suspensões de eritrócitos de 15 indivíduos normais e 29 pacientes com anemia falciforme, estratificados em seus haplótipos (BEN/BAN (n=11); BAN/BAN(n=15), BEN/BEN (n=2); SEN/SEM (n=1) submetidos ao estresse oxidativo de 75 μ moles/l de TBHP, analisados em quadruplicata com concentrações de 30, 50 e 100 μ moles/l de miricetina. As barras de erro representam os erros padrões.

*Diferença estatisticamente significativa entre a produção de ERO a nível basal e pela ação do *t*-BHP.

δ Diferença estatisticamente significativa entre a concentração de 30 μ moles/l e o nível basal.

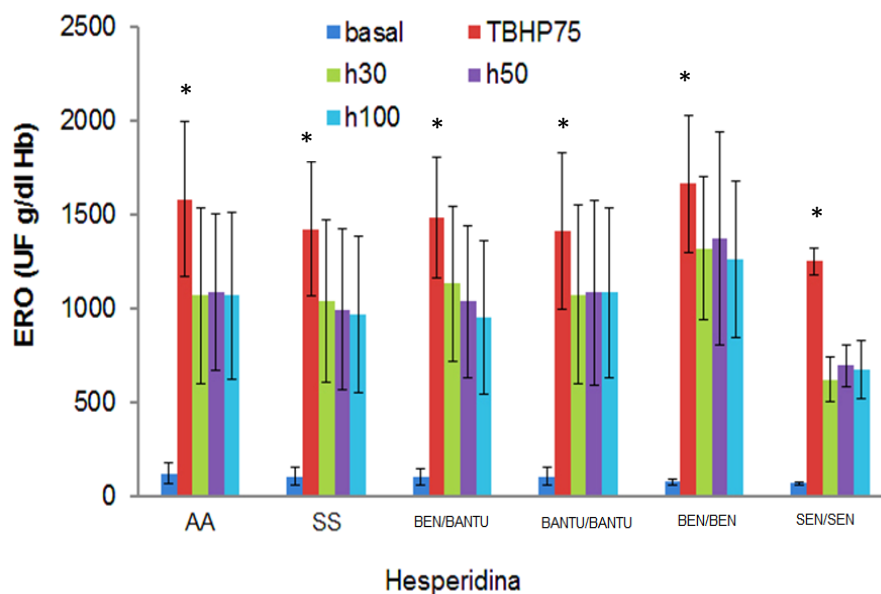


FIGURA 47 - PRODUÇÃO DE ERO EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS SUBMETIDOS AÇÃO PROTETORA DA RUTINA (30,50 e 100 μ moles/l) COM POSTERIOR AÇÃO OXIDANTE DO t -BHP.

NOTA: Produção de ERO (UF/gHb) detectadas em suspensões de eritrócitos de 15 indivíduos normais e 29 pacientes com anemia falciforme, estratificados em seus haplótipos (BEN/BAN (n=11); BAN/BAN(n=15), BEN/BEN (n=2); SEN/SEN (n=1) submetidos ao estresse oxidativo de 75 μ moles/l de TBHP, analisados em quadruplicata com concentrações de 30, 50 e 100 μ moles/l de rutina. As barras de erro representam os erros padrões.

*Diferença estatisticamente significativa entre a produção de ERO a nível basal e pela ação do t -BHP.

5.5 PORCENTAGEM DE HEMÓLISE

A Figura 48 apresenta as porcentagens de hemólise entre os grupos AA e SS. A Figura 49 ilustra o comportamento dos flavonoides com relação a sua capacidade de evitar a hemólise nos haplótipos do grupo SS. Os resultados foram descritos em porcentagem, sendo que a hemólise total (100%) foi considerada para as amostras tratadas somente com o AAPH. O grupo AA demonstrou médias de porcentagem mais baixas, quando comparados ao grupo SS em seus haplótipos. A inibição da hemólise foi dose-dependente em todos os flavonoides, com exceção da hesperidina, onde as médias encontradas foram muito semelhantes nas duas concentrações estudadas. O comportamento da miricetina, da quercetina e da rutina foram praticamente idênticos entre os haplótipos (Tabela 4) não havendo diferença estatisticamente significativa em todas as concentrações estudadas. Foi verificada diferença estatisticamente significativa entre o grupo AA e o haplótipo BAN/BAN do grupo SS na análise da miricetina (50 $\mu\text{moles/l}$) e da hesperidina na concentração de 100 $\mu\text{moles/l}$.

TABELA 4 - MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DA PORCENTAGEM DE HEMÓLISE NOS ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E EM PACIENTES DE ANEMIA FALCIFORME, ESTRATIFICADO EM SEUS HAPLÓTIPOS.

	MIR 50 $\mu\text{moles/l}$	MIR 100 $\mu\text{moles/l}$	RUT 50 $\mu\text{moles/l}$	RUT 100 $\mu\text{moles/l}$	QUE 50 $\mu\text{moles/l}$	QUE 100 $\mu\text{moles/l}$	HES 50 $\mu\text{moles/l}$	HES 100 $\mu\text{moles/l}$
AA (n=15)	36,1 \pm 14,7	22,6 \pm 14,0	39,7 \pm 13,3	19,7 \pm 15,0	43,5 \pm 17,1	23,0 \pm 14,9	56,8 \pm 10,2	42,5 \pm 13,9
BEN/BAN (n=14)	54,2 \pm 21,4	37,3 \pm 22,2	56,7 \pm 23,3	24,1 \pm 23,6	50,1 \pm 21,5	23,2 \pm 22,9	59,5 \pm 17,8	58,8 \pm 21,7
BAN/BAN (n=12)	58,7 \pm 21,9*	41,7 \pm 26,2	57,7 \pm 18,4	37,2 \pm 31,2	58,2 \pm 21,2	40,5 \pm 25,2	67,6 \pm 13,3	62,1 \pm 19,5**
BEN/BEN (n=2)	49,3 \pm 35,8	45,7 \pm 38,9	72,6 \pm 18,0	30,5 \pm 19,3	41,2 \pm 24,8	33,2 \pm 19,6	71,5 \pm 1,55	72,5 \pm 3,8
SEN/SEN (n=1)	24,6	19,0	54,4	23,9	56,8	24,3	52,9	61,9

NOTA:*Diferença estatisticamente significativa entre grupo AA e o haplótipo BAN/BAN com a miricetina 50 $\mu\text{moles/l}$.

**Diferença estatisticamente significativa entre grupo AA e o haplótipo BAN/BAN com a hesperidina 100 $\mu\text{moles/l}$.

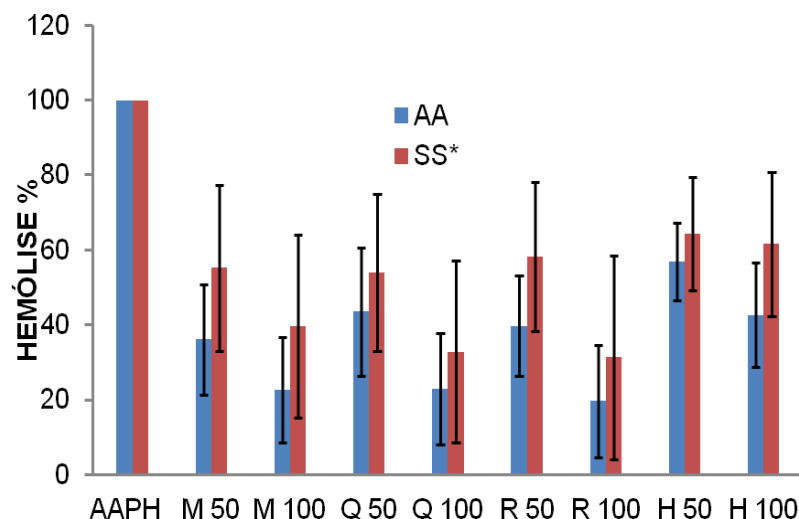


FIGURA 48 – PORCENTAGEM DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME, INCUBADOS COM MIRICETINA, QUERCETINA, RUTINA E HESPERIDINA NAS CONCENTRAÇÕES DE 50 e 100 μ moles/l, SUBMETIDOS A AÇÃO HEMOLISANTE DO AAPH 100 mmoles/l.

NOTA: Porcentagens de hemólise de suspensões de eritrócitos (hematócrito 10%) de 15 indivíduos normais e 29 pacientes com anemia falciforme, após a incubação a 37°C por 3 horas com AAPH 100 mmoles/l. As barras de erro representam os desvios padrão. M=miricetina, Q=quercetina, R=rutina, H=hesperidina; 50= 50 μ moles/l 100= μ moles/l.

*Diferença estatisticamente significativa entre grupo AA e o grupo SS em todos os flavonoides testados.

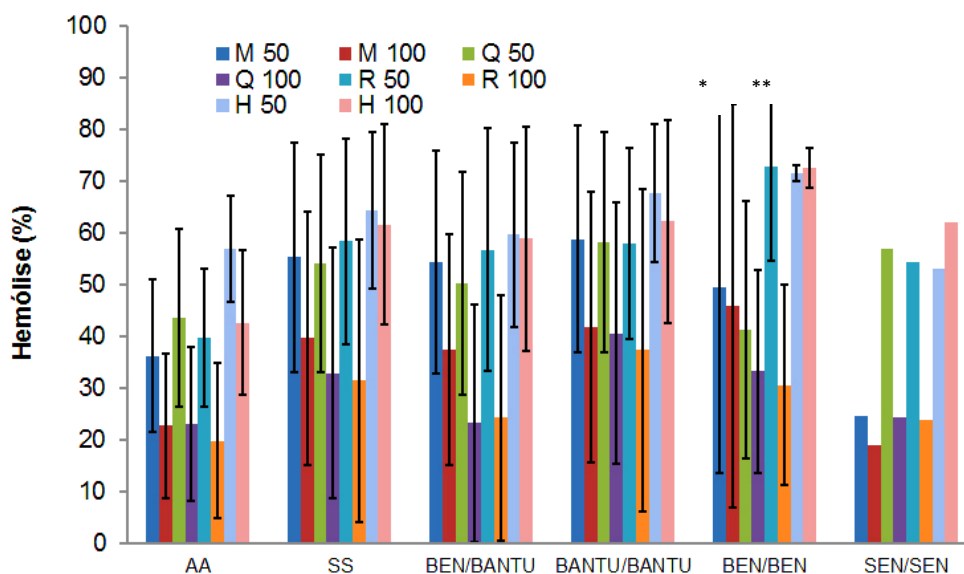


FIGURA 49 – PORCENTAGEM DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS, INCUBADOS COM QUERCETINA, RUTINA, MIRICETINA E HESPERIDINA 50 E 100 μ MOLES/L, SUBMETIDOS A AÇÃO HEMOLISANTE DO AAPH 100 MMOLES/L.

NOTA: Porcentagens de hemólise de suspensões de eritrócitos (hematócrito 10%) de 15 indivíduos normais e 29 pacientes com anemia falciforme, estratificados em seus haplótipos (BEN/BAN (n=11); BAN/BAN(n=15), BEN/BEN(n=2); SEN/SEN(n=1) após a incubação a 37°C por 3 horas com AAPH 100 mmoles/l. As barras de erro representam os desvios padrão.

*Diferença estatisticamente significativa entre grupo AA e o haplótipo BAN/BAN com miricetina 50 μ moles/l.

**Diferença estatisticamente significativa entre grupo AA e o haplótipo BAN/BAN com hesperidina 100 μ moles/l).

5.6 SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

Determinou-se a peroxidação lipídica pela dosagem de TBARS em suspensões de eritrócitos de indivíduos normais (grupo AA) e de pacientes com anemia falciforme (grupo SS). A Tabela 5 apresenta as médias e o desvio padrão dos valores encontrados para TBARS no estado basal, pela ação do *t*-BHP e a atividade antioxidante dos flavonoides. A Tabela 6 apresenta o grupo SS estratificado em seus haplótipos. No estado basal não foi verificada diferença entre o grupo AA e o grupo SS, porém, os eritrócitos do grupo SS quando tratados com *t*-BHP produziram mais TBARS do que os eritrócitos normais (Grupo AA), o que demonstra a tendência oxidativa da doença. Houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos estudados, com maior produção de TBARS no

grupo SS mesmo com ação dos flavonoides em comparação com o perfil encontrado no grupo AA.

Os flavonoides demonstraram ação dose-dependente, com exceção da hesperidina. Dos polifenóis estudados, a quercetina apresentou o melhor efeito protetor contra a ação oxidativa do *t*-BHP. Por outro lado, a hesperidina foi menos eficiente na sua atividade antioxidante quando comparada aos outros polifenóis testados. A ação do *t*-BHP no grupo SS produziu, em média, aproximadamente 3 vezes mais TBARS quando comparados com o grupo AA, mesmo com ação dos flavonoides. A figura 50 ilustra o comportamento geral do TBARS em todos os grupos estudados sem a divisão do grupo SS em seus haplótipos.

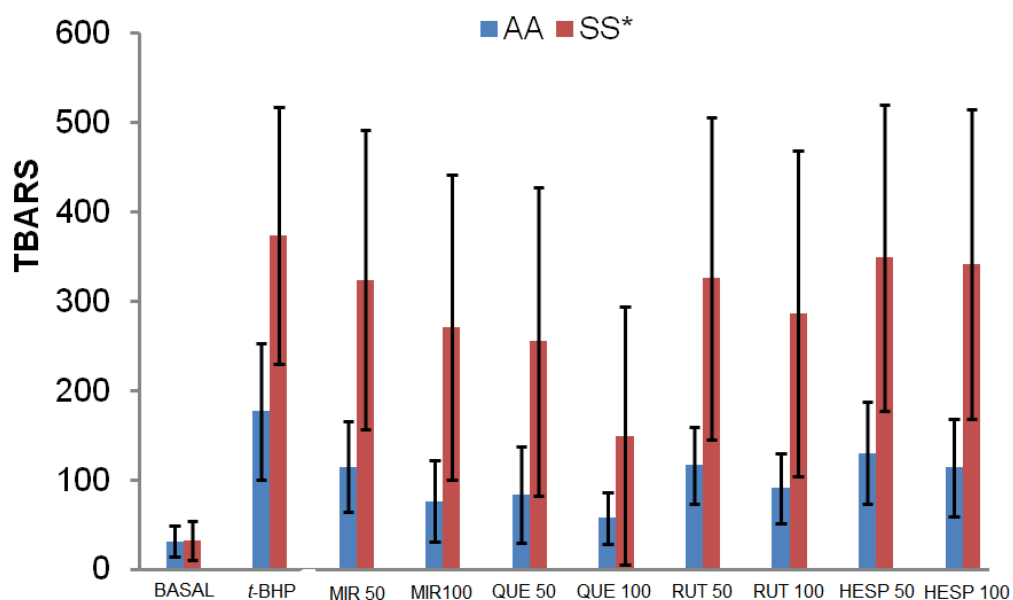


FIGURA 50 – PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (nmol/g de hemoglobina) EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DO *t*-BHP 3mmol/l APÓS A INCUBAÇÃO COM OS FLAVONOIDES NAS CONCENTRAÇÕES DE 50 E 100 μ mol/l. NOTA:*Diferença estatisticamente significativa entre grupo AA e o grupo SS em todos os flavonoides testados.

TABELA 5 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO TBARS (nmoles/g DE HEMOGLOBINA) EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS (AA) E PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS) SUBMETIDOS AO ESTRESSE OXIDATIVO PELO *t*-BHP APÓS A INCUBAÇÃO COM MIRICETINA, QUERCETINA, RUTINA E HESPERIDINA.

TRATAMENTO	MÉDIA		DESVIO PADRÃO		<i>p</i>
	AA	SS*	AA	SS	
BASAL	31,55	32,49	17,05	21,55	0,885155
<i>t</i> -BHP 2 mmoles/l	177,13	374,18	76,44	144,08	0,000017
MIRICETINA 50 µmoles/l	114,83	324,19	50,4437	167,53	0,000035
MIRICETINA 100 µmoles/l	76,28	270,82	45,96	170,52	0,000113
QUERCETINA 50 µmoles/l	83,56	255,32	53,69	172,80	0,000609
QUERCETINA 100 µmoles/l	57,48	149,61	29,15	144,60	0,019949
RUTINA 50 µmoles/l	116,58	325,77	43,43	180,19	0,000094
RUTINA 100 µmoles/l	90,77	286,44	38,69	182,01	0,000226
HESPERIDINA 50 µmoles/l	130,01	348,87	57,25	171,64	0,000028
HESPERIDINA 100 µmoles/l	114,20	341,14	54,42	173,42	0,000018

NOTA: AA = grupo controle indivíduos normais; SS = grupo anemia falciforme.

TABELA 6 – PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (nmoles/g de hemoglobina) EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS (AA) E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS) ESTRATIFICADO EM SEUS HAPLÓTIPOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE OXIDATIVO PELO *t*-BHP APÓS A INCUBAÇÃO COM MIRICETINA, QUERCETINA, RUTINA E HESPERIDINA.

	MÉDIA±DP				
	BEN/BAN (n= 11)	BAN/BAN (n=15)	BEN/BEN (n=2)	SEN/SEN (n=1)	AA (n=15)
BASAL	31,2±18,8	30,9±23,6	41,2±32,3	52,2	31,5±17,0
T-BHP 2 mmoles/l*	426,0±78,1*	332,1±156,5*	495,0±242,6*	254,0	177,1±76,4*
MIRICETINA 50 µmoles/l*	330,8±104,4*	300,8±151,8*	506,5±470,3*	204,0	114,8±50,4*
100 µmoles/l*	271,1±114,3*	254,9±152,8*	430,5±488,0*	170,9	76,2±45,9*
QUERCETINA 50 µmoles/l**	254,7±128,4**	229,7±162,7	468,2±407,5**	192,3	83,5±53,6**
100 µmoles/l***	114,9±50,8	133,2±131,0	415,4±350,2***	159,0	57,4±29,1***
RUTINA 50 µmoles/l*	333,1±89,3*	300,5±181,2*	520,5±438,2*	180,4	116,5±43,4*
100 µmoles/l*	278,9±121,7*	267,6±168,7*	504,6±446,0*	154,3	90,7±38,6*
HESPERIDINA 50 µmoles/l*	376,1±88,9*	317,5±155,4*	515,1±499,7*	178,0	30,0±57,2*
100 µmoles/l*	359,0±113,0*	316,6±139,7*	515,6±526,3*	149,5	114,2±54,4*

NOTA: *DiferençaS estatisticamente significativas entre grupo AA e os haplótipos BEN/BAN, BAN/BAN e BEN/BEN.

**DiferençaS estatisticamente significativas entre grupo AA e os haplótipos BEN/BAN e BEN/BEN.

*** Diferenças estatisticamente significativas entre grupo AA e o haplótipo BEN/BEN.

As Figuras 51 a 54 representam a peroxidação lipídica das amostras de indivíduos normais (AA) e pacientes com anemia falciforme (SS) estratificado em seus haplótipos. Em todas as concentrações dos flavonoides testadas foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os haplótipos e o grupo AA.

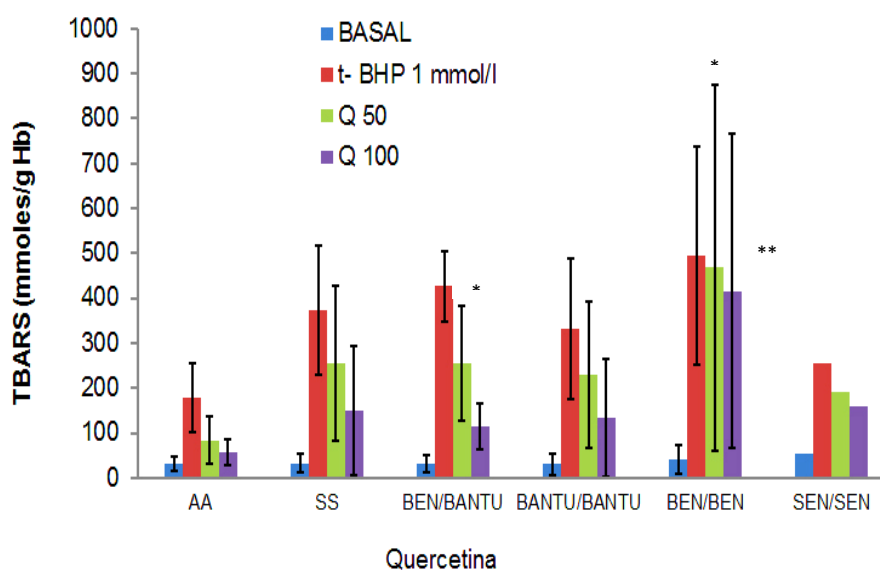


FIGURA 51 – PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (nmol/g de hemoglobina) EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADO EM SEUS HAPLÓTIPOS (BEN/BAN (n=11); BAN/BAN (n=15), BEN/BEN (n=2); SEN/SEN (n=1) SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DO t-BHP 3 mmol/l APÓS A INCUBAÇÃO COM QUERCETINA 50 e 100 μ mol/l.

NOTA: *Diferença estatisticamente significativa entre grupo AA e os haplótipos BEN/BAN e BEN/BEN (Quercetina 50 μ mol/l).

**Diferença estatisticamente significativa entre grupo AA e o haplótipo BEN/BEN (Quercetina 100 μ mol/l).

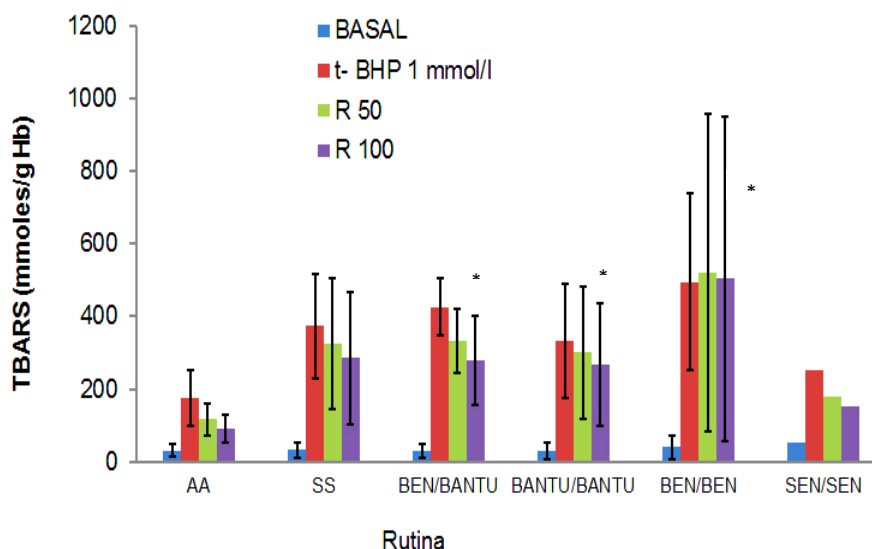


FIGURA 52 – PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (nmol/g de hemoglobina) EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS (BEN/BAN (n=11); BAN/BAN (n=15), BEN/BEN (n=2); SEN/SEN (n=1) SUBMETIDOS A AÇÃO OXIDANTE DO *t*-BHP 2 mmol/l APÓS A INCUBAÇÃO COM RUTINA 50 e 100 μ mol/l. NOTA: *Diferença estatisticamente significativa entre grupo AA e os haplótipos BEN/BAN, BAN/BAN e BEN/BEN (Rutina 50 e 100 μ mol/l).

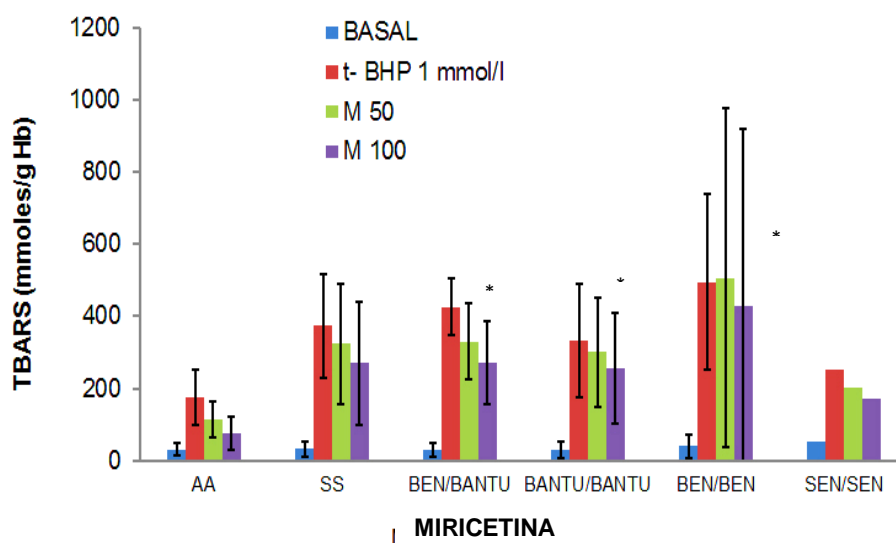


FIGURA 53 – PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (nmol/g de hemoglobina) EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADO EM SEUS HAPLÓTIPOS (BEN/BAN (n=11); BAN/BAN (n=15), BEN/BEN (n=2); SEN/SEN (n=1) SUBMETIDOS A AÇÃO OXIDANTE DO *t*-BHP 2 mmol/l APÓS A INCUBAÇÃO COM MIRICETINA 50 e 100 μ mol/l. NOTA: *Diferenças estatisticamente significativas entre grupo AA e os haplótipos BEN/BAN, BAN/BAN e BEN/BEN (Miricetina 50 e 100 μ mol/l).

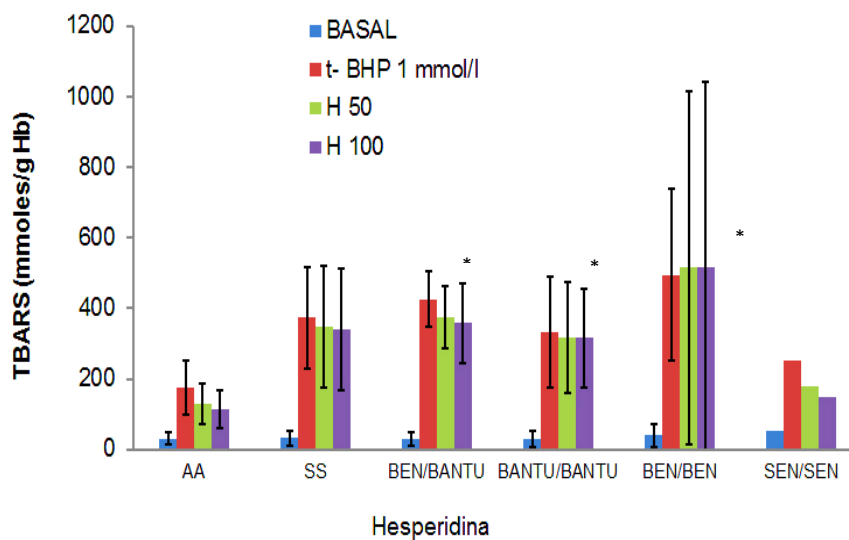


FIGURA 54 – PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (nmol/g de hemoglobina) EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADO EM SEUS HAPLÓTIPOS (BEN/BAN (n=11); BAN/BAN (n=15), BEN/BEN (n=2); SEN/SEN (n=1) SUBMETIDOS A AÇÃO OXIDANTE DO t-BHP 3mmol/l APÓS A INCUBAÇÃO COM HESPERIDINA 50 e 100 μmol/l. NOTA: *Diferença estatisticamente significativa entre grupo AA e os haplótipos BEN/BAN, BAN/BAN e BEN/BEN (Hesperidina 50 e 100 μmol/l).

5.7 METAHEMOGLOBINA

Utilizando-se a técnica padronizada segundo Naoum (2003), avaliou-se a porcentagem de metahemoglobina em eritrócitos de indivíduos normais e de pacientes com anemia falciforme submetidos ao estresse oxidativo pelo *t*-BHP e testou-se o efeito protetor dos flavonoides. Observou-se que a porcentagem de metahemoglobina foi mais elevada no grupo SS ($4,45 \pm 0,38\%$) em comparação com o grupo controle ($3,44 \pm 1,10\%$). O mesmo comportamento foi observado quando as suspensões de eritrócitos foram submetidas ao estresse oxidativo pelo *t*-BHP na concentração de 1 mmol/l. Nenhum flavonoide apresentou efeito protetor sobre a produção de metahemoglobina pela ação do *t*-BHP. As médias \pm DP estão apresentados na Tabela 7. A Figura 55 exemplifica as diferenças entre os dois grupos estudados em relação aos valores basais e sob ação do *t*-BHP.

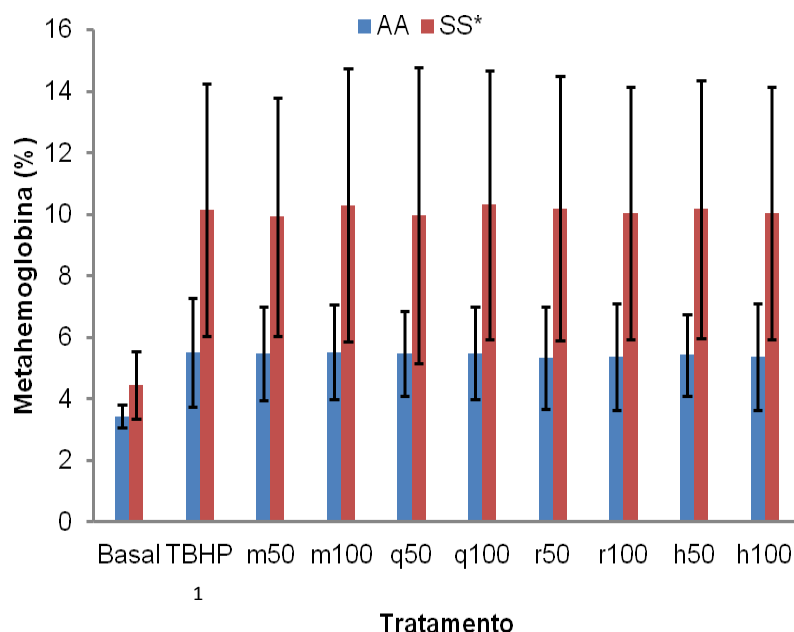


FIGURA 55 - PORCENTAGEM DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME NO ESTADO BASAL, SUBMETIDOS A AÇÃO OXIDANTE DO T-BHP (1mmol/l) E DOS FLAVONOIDES.

NOTA: Porcentagens de meta-Hb de suspensões de eritrócitos de indivíduos normais e pacientes de anemia falciforme, antes e após incubação a temperatura ambiente com *t*-BHP 1 mmol/l por 15 minutos. A incubação com os flavonoides por 1 hora a temperatura ambiente.

t- BHP= terc-butilhidroperóxido; M = miricetina; Q = quercetina; R = rutina; H = hesperidina.50 = 50 mmoles/l; 100=100mmoles/l.

*Diferenças estatisticamente significativa entre os grupos estudados. As barras de erro representam os erros padrões.

TABELA 7 – PORCENTAGEM DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME NO ESTADO BASAL, SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DO *t*-BHP (1mmoles/l) E DOS FLAVONOIDES.

Tratamento		Média Metahemoglobina		
		AA	SS*	<i>p</i>
Basal		3,44±0,38	4,45±1,10	0,001286
<i>t</i> -BHP	1 moles/l	5,52±1,77	10,15±4,12	0,000161
Miricetina	50 mmoles/l	5,48±1,51	9,92±3,88	0,000116
	100 mmoles/l	5,53±1,53	10,30±4,45	0,000240
Quercetina	50 mmoles/l	5,48±1,37	9,96±4,81	0,001075
	100 mmoles/l	5,49±1,50	10,31±4,36	0,000164
Rutina	50mmoles/l	5,33±1,66	10,20±4,30	0,000135
	100mmoles/l	5,37±1,73	10,03±4,10	0,000140
Hesperidina	50mmoles/l	5,43±1,32	10,17±4,19	0,000118
	100mmoles/l	5,37±1,73	10,03±4,10	0,000079

As Figuras 56 a 59 ilustram as dosagens de metahemoglobina no estado basal, após a ação do *t*-BHP e o efeito dos flavonoides no grupo AA e no grupo SS estratificado em seus haplótipos. O comportamento da metahemoglobina verificado foi o mesmo encontrado sem a divisão do grupo SS, ou seja, houve diferença entre os grupos no estado basal, maior produção de metahemoglobina pela ação do *t*-BHP e nenhum dos flavonoides demonstrou atividade protetora contra a elevação da metahemoglobina.

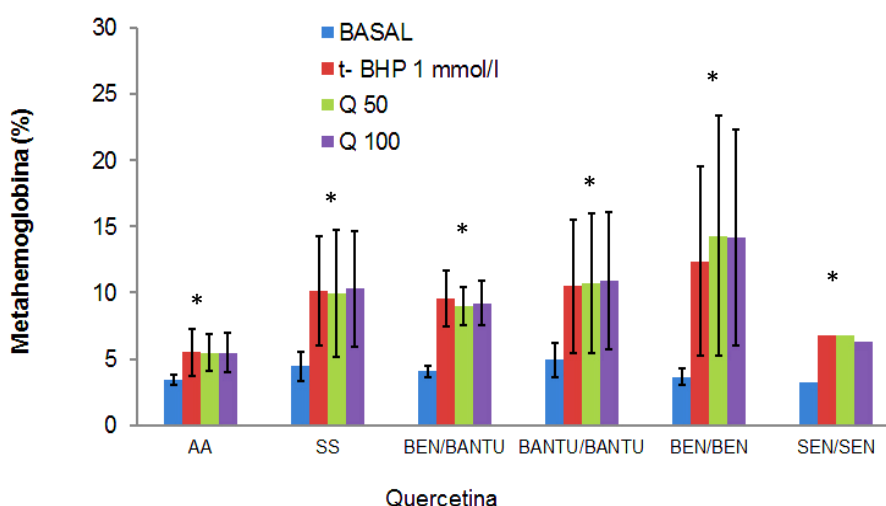


FIGURA 56 – PORCENTAGEM DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS (BEN/BAN (n=11); BAN/BAN (n=15), BEN/BEN (n=2); SEN/SEN (n=1) SUBMETIDOS A AÇÃO OXIDANTE DO *t*-BHP 1mmoles/l APÓS A INCUBAÇÃO COM QUERCETINA 50 E 100 μ moles/l.

NOTA: *Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados. As barras de erro representam os erros padrões.

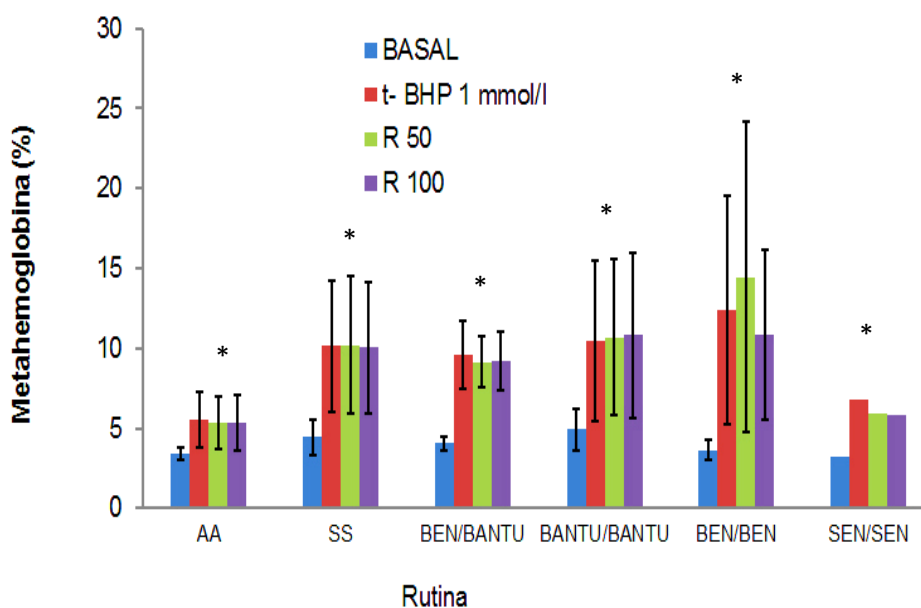


FIGURA 57 – PORCENTAGEM DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS (BEN/BAN (n=11); BAN/BAN (n=15), BEN/BEN (n=2); SEN/SEN (n=1) SUBMETIDOS A AÇÃO OXIDANTE DO *t*-BHP 1 mmoles/l APÓS A INCUBAÇÃO COM RUTINA 50 e 100 μ moles/l.

NOTA: *Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados. As barras de erro representam os erros padrões.

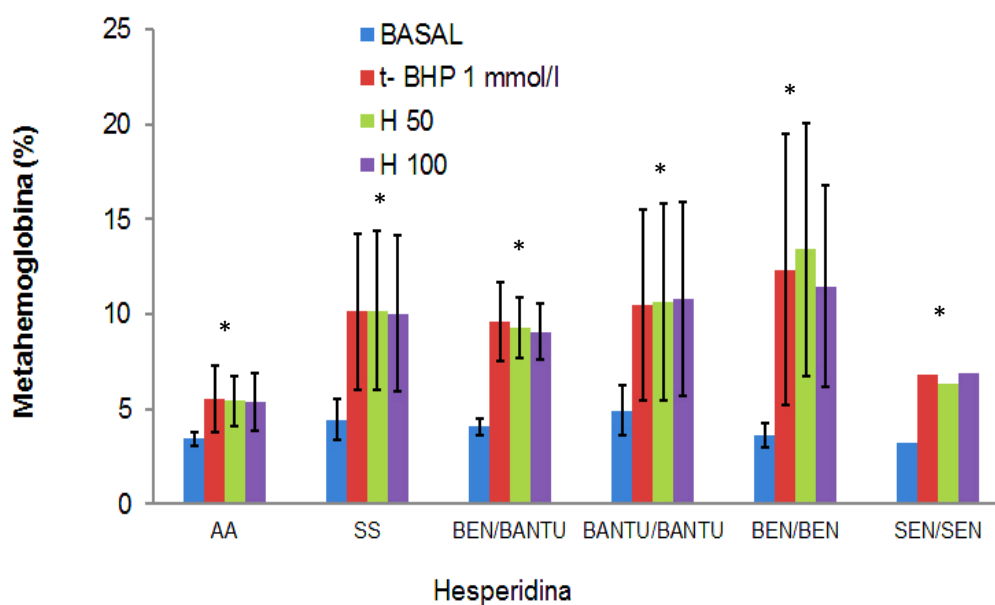


FIGURA 58 – PORCENTAGEM DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS (BEN/BAN (n=11); BAN/BAN (n=15), BEN/BEN (n=2); SEN/SEN (n=1) SUBMETIDOS A AÇÃO OXIDANTE DO *t*-BHP 1 mmoles/l APÓS A INCUBAÇÃO COM HESPERIDINA 50 E 100 mmoles/l.

NOTA: *Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados. As barras de erro representam os erros padrões.

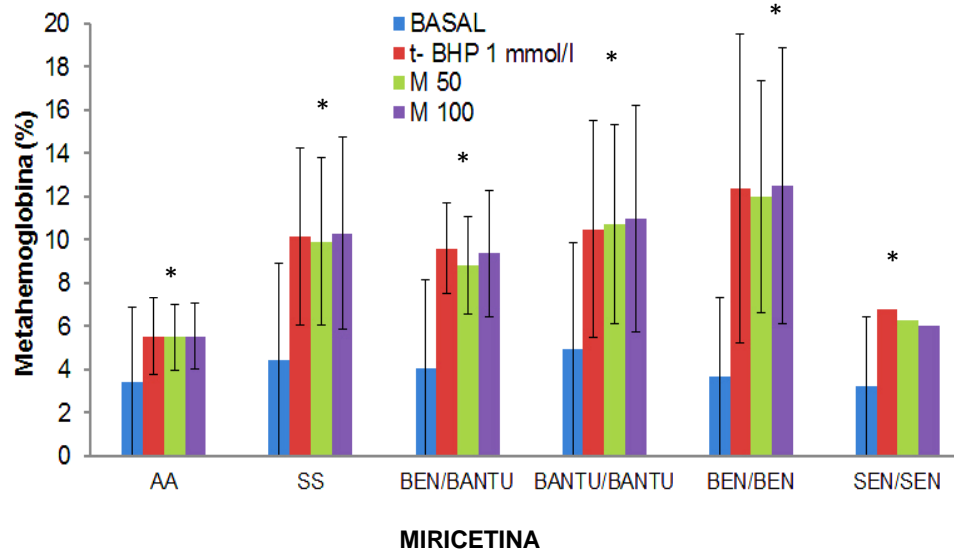


FIGURA 59 – PORCENTAGEM DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS (BEN/BAN (n=11); BAN/BAN (n=15), BEN/BEN (n=2); SEN/SEN (n=1) SUBMETIDOS A AÇÃO OXIDANTE DO t-BHP 1mmoles/l APÓS A INCUBAÇÃO COM MIRICETINA 50 E 100 μ moles/l.

NOTA: *Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados. As barras de erro representam os erros padrões.

5.8 GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

A Tabela 8 demonstra as médias e os desvios padrão da dosagem de GSH nos grupos AA e SS. No estado basal, as médias foram praticamente idênticas, sem diferenças significativas entre elas. O *t*-BHP na concentração 3 mmoles/l consumiu praticamente toda a GSH e os flavonoides não apresentaram nenhum efeito protetor mediante ao poder oxidante do *t*-BHP 3 mmoles/l. A Figura 60 ilustra o comportamento geral da GSH frente ao estresse oxidativo e a ação antioxidante dos flavonoides.

TABELA 8 - CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME NO ESTADO BASAL, TRATADOS COM MIRICETINA, QUERCETINA, RUTINA E HESPERIDINA NA CONCENTRAÇÃO DE 200 μ moles/l DE CADA FLAVONOIDE, COM POSTERIOR INCUBAÇÃO COM *t*-BHP 3 mmoles/l.

Tratamento	Média \pm DP		Obs
	AA	SS	
BASAL	7,94 \pm 1,38*	7,78 \pm 2,29*	NS
<i>t</i> - BHP 3 mmoles/l	0,50 \pm 0,36	1,02 \pm 0,84	S
MIRICETINA 200 μ moles/l	0,63 \pm 0,41	0,77 \pm 0,70	S
QUERCETINA 200 μ moles/l	0,44 \pm 0,28	0,76 \pm 0,72	S
RUTINA 200 μ moles/l	0,46 \pm 0,35	0,82 \pm 0,90	S
HESPERIDINA 200 μ moles/l	0,54 \pm 0,32	0,86 \pm 0,89	S

NOTA: Concentração de GSH em suspensões de eritrócitos (hematócrito 40%) de 29 indivíduos pacientes de anemia falciforme e de 15 indivíduos normais.

*Diferenças estatisticamente significativas entre o nível basal nos grupos estudados em relação a ação do *t*-BHP e os flavonoides testados.

NS: Não significante; S: Significante.

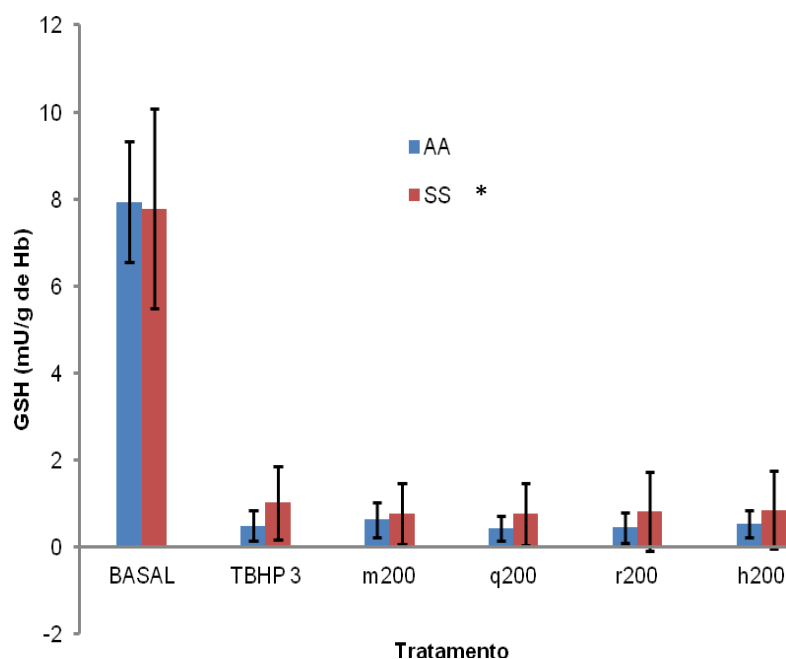


FIGURA 60 - CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME NO ESTADO BASAL, TRATADOS COM MIRICETINA, QUERCETINA, RUTINA E HESPERIDINA NA CONCENTRAÇÃO DE 200 μ moles/l DE CADA FLAVONOIDE, COM POSTERIOR INCUBAÇÃO COM *t*-BHP 3 mmoles/l.

NOTA: Concentração de GSH em suspensões de eritrócitos (hematócrito 40%) de 29 indivíduos pacientes de anemia falciforme e de 15 indivíduos normais.

*Diferenças estatisticamente significativa entre o nível basal nos grupos estudados em relação à ação do *t*-BHP e os flavonoides testados.

A Figura 61 demonstra o comportamento da GSH no estado basal, pela ação do *t*-BHP e a ação antioxidante dos flavonoides nos grupos estudados, porém, estratificados nos haplótipos do grupo SS. O paciente com o haplótipo SEN/SEN demonstrou diferença estatisticamente significativa no estado basal e no comportamento protetor dos flavonoides estudados quando comparado com o grupo AA, apresentando menor concentração basal de GSH. O grupo BEN/BEN, apresentou diferenças significativas no tratamento das amostras com a rutina e a hesperidina.

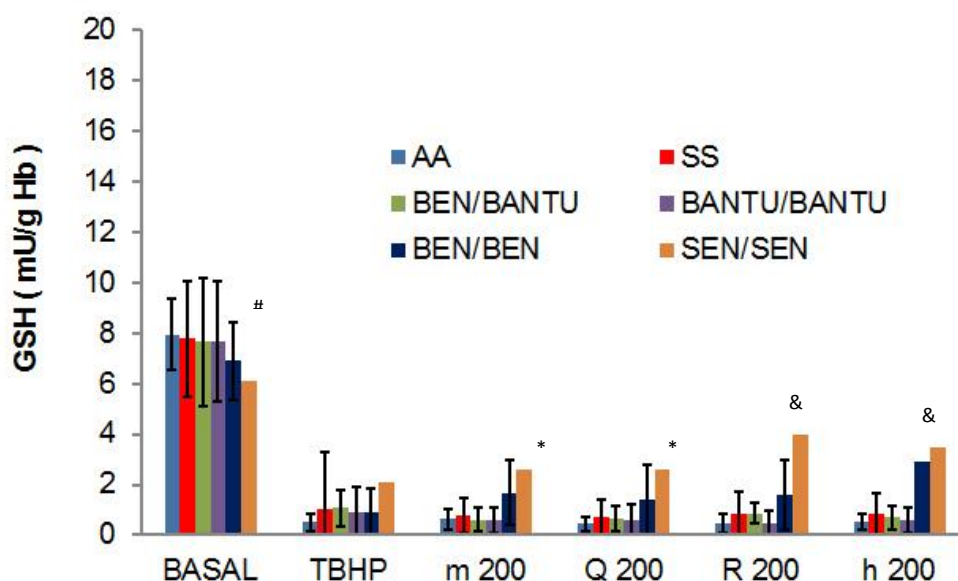


FIGURA 61 – CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADOS EM SEUS HAPLÓTIPOS (BEN/BAN (n=11); BAN/BAN (n=15), BEN/BEN (n=2); SEN/SEN (n=1) NO ESTADO BASAL, SUBMETIDOS A AÇÃO OXIDANTE DO *t*-BHP 3 mmoles/l E APÓS A INCUBAÇÃO COM MIRICETINA, QUERCETINA, RUTINA E HESPERIDINA 200 μ moles/l.

NOTA: Concentração de GSH em suspensões de eritrócitos (hematócrito 40%) de 29 indivíduos pacientes de anemia falciforme (BEN/BAN (n=11); BAN/BAN (n=15), BEN/BEN (n=2); SEN/SEN (n=1) e de 15 indivíduos normais. As barras de erro representam os erros padrões.

Diferença estatisticamente significativa entre o grupo AA com os haplótipos BEN/BEN e SEN/SEN a nível basal.

* Diferenças estatisticamente significativas entre o grupo AA e o haplótipo SEN/SEN.

& Diferenças estatisticamente significativas entre o grupo AA e os haplótipos BEN/BEN e SEN/SEN.

5.9 DETERMINAÇÃO DE GLICOSE 6- FOSFATO DESIDROGENASE

A Tabela 9 demonstra os valores médios e os desvios padrão da concentração de G6PD no grupo AA e no grupo SS. A Figura 62 também ilustra este comportamento. No estado basal, a diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa, com médias mais elevadas no grupo SS (média de 13,01 *versus* 6,39 mU/gHb).

A ação oxidante do *t*-BHP foi mais pronunciada no grupo SS, pois apesar da maior atividade de G6-PD no estado basal, as médias encontradas após a ação do *t*-BHP foram semelhantes entre o grupo AA e o grupo SS. O *t*-BHP consumiu cerca de 60% da G6-PD no grupo SS, enquanto que no grupo AA, houve uma diminuição de aproximadamente 20% da atividade da G6-PD. Nenhum dos flavonoides apresentou capacidade de proteger os eritrócitos do consumo da G6PD pelo *t*-BHP nos dois grupos estudados.

TABELA 9 - ATIVIDADE DA G6-PD EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E PACIENTES PACIENTES DE ANEMIA FALCIFORME SUBMETIDOS AO ESTRESSE OXIDATIVO PELO *t*-BHP APÓS A INCUBAÇÃO COM MIRICETINA, QUERCETINA, RUTINA E HESPERIDINA NAS CONCENTRAÇÕES DE 200 μ moles/l.

	Atividade de G6-PD(mU/gHb)		Obs
	AA	SS	
Basal	6,39 \pm 0,90	13,01 \pm 4,75*	S
<i>t</i> - BHP 3mmoles/l	4,99 \pm 0,70	5,25 \pm 2,84	NS
Miricetina 200mmoles/l	5,06 \pm 0,78	5,55 \pm 2,84	NS
Quercetina 200mmoles/l	5,28 \pm 0,56	6,53 \pm 4,18	NS
Rutina 200mmoles/l	5,03 \pm 0,63	5,63 \pm 3,15	NS
Hesperidina 200mmoles/l	5,05 \pm 0,58	4,95 \pm 2,82	NS

NOTA: Atividade Enzimática de G6-PD de 29 indivíduos pacientes de anemia falciforme (BEN/BAN (n=11); BAN/BAN (n=15), BEN/BEN (n=2); SEN/SEN (n=1) e de 15 indivíduos normais.

*Diferenças estatisticamente significativa a nível basal nos grupos estudados.

S: Significante;NS: Não significativo.

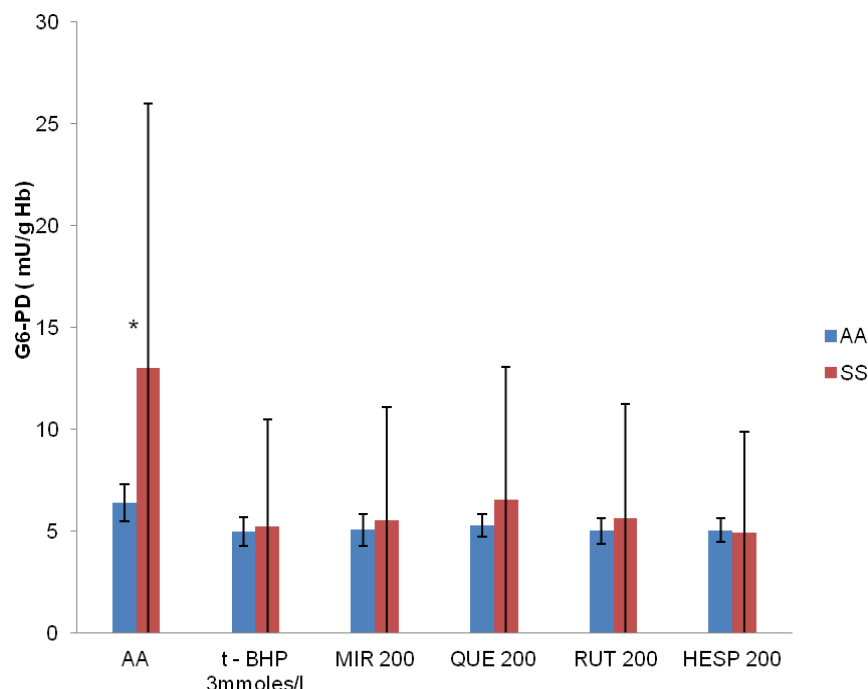


FIGURA 62- CONCENTRAÇÃO DE G6-PD EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES PACIENTES DE ANEMIA FALCIFORME SUBMETIDOS AO ESTRESSE OXIDATIVO PELO *t*-BHP (3 mmoles/l) APÓS A INCUBAÇÃO COM MIRICETINA, QUERCETINA, RUTINA E HESPERIDINA 200 μ moles/l.

NOTA: * Diferença estatisticamente significativa entre o grupo AA e o grupo SS a nível basal. As barras de erro representam os erros padrões.

A Tabela 10 representa os valores médios e o desvio padrão da concentração de G6-PD nos eritrócitos de indivíduos normais e de pacientes de anemia falciforme estratificado em seus haplótipos. Entre os haplótipos, os eritrócitos de pacientes do grupo BAN/BAN apresentaram médias superiores aos outros haplótipos (14,41 mU/gHb), enquanto o paciente portador do haplótipo SEN/SEN apresentou concentração de G6PD de 9,72 mU/gHb. Houve diferença significativa no estado basal entre o grupo AA e os haplótipos BEN/BAN, BAN/BAN e BEN/BEN. O *t*-BHP consumiu entre 50 a 60% da G6PD entre os haplótipos. No paciente do haplótipo SEN/SEN, este consumo foi maior (\cong 80%). Nenhum dos polifenóis testados apresentou capacidade protetora contra a ação oxidativa do *t*-BHP, para o consumo de G6PD. A Figura 63 resume o comportamento da concentração da G6PD nos grupos AA e SS (estratificados em seus haplótipos), no estado basal, sob a ação do *t*-BHP (3mmoles/l) e dos flavonoides estudados.

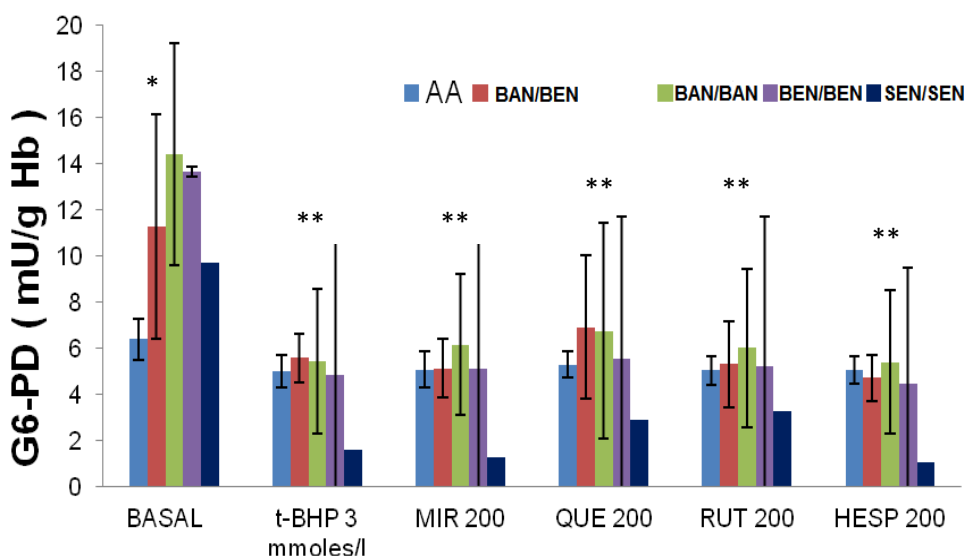


FIGURA 63 - CONCENTRAÇÃO DE G6-PD EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS SUBMETIDOS AO ESTRESSE OXIDATIVO PELO *t*-BHP APÓS A INCUBAÇÃO COM MIRICETINA, QUERCETINA, RUTINA E HESPERIDINA..

NOTA: * Para os controles, a atividade em AA é menor, com diferença significativa em relação aos haplótipos BEN/BAN e BAN/BAN(Tukey, $p=0,020$).

** Não houve diferença significativa em relação aos demais tratamentos para todos os haplótipos.

Controle – Valores basais, sem tratamento; *t*-BHP 3 – *t*BHP 3mmoles/l; m200 – miricetina 200 μ moles/l; q200 - quercetina 200 μ moles/l; r200 - rutina 200 μ moles/l; h200 - hesperidina 200 μ moles/l.

As barras de erro representam os erros padrões

TABELA 10 - VALORES MÉDIOS DA ATIVIDADE DA G6-PD EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E PACIENTES PACIENTES DE ANEMIA FALCIFORME ESTRATIFICADO EM SEUS HAPLÓTIPOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE OXIDATIVO PELO *t*-BHP APÓS A INCUBAÇÃO COM MIRICETINA, QUERCETINA, RUTINA E HESPERIDINA NA CONCENTRAÇÃO DE 200 μ moles/l.

G6-PD Médias±D.P. (mU/gHb)	Tratamentos	AA	BEN/BAN (n=11)	BAN/BAN (n=15)	BEN/BEN (n=2)	SEN/SEN (n=1)
	Controle	6,39±0,90	11,28±4,86*	14,41±4,80*	13,65±0,21	9,72
	<i>t</i> -BHP 3mmoles/l	4,99±0,70	5,56±1,05	5,41±3,13	4,83±5,90	1,56
	Miricetina 200 μ moles/l	5,06±0,78	5,11±1,27	6,14±3,06	5,12±5,49	1,24
	Quercetina 200 μ moles/l	5,28±0,56	6,90±3,12	6,73±4,69	5,55±6,16	2,88
	Rutina 200 μ moles/l	5,03±0,63	5,29±1,85	6,00±3,44	5,18±6,53	3,26
	Hesperidina 200 μ moles/l	5,05±0,58	4,69±1,00	5,38±3,10	4,43±5,05	1,04

NOTA: * Para os controles, a atividade em AA é menor, com diferença significativa em relação aos haplótipos BEN/BAN e BAN/BAN(Tukey, $p=0,020$).

6 DISCUSSÃO

A anemia falciforme é a doença hematológica herdada mais comum em todo o mundo, sendo considerada a doença genética de maior prevalência no Brasil. A doença, originária da África, surgiu há cerca de 100 mil anos, entre os períodos paleolítico e mesolítico, tendo se estendido para a península Arábica e Índia, e vindo para a América através do comércio de escravos negros trazidos do continente africano, distribuindo-se heterogeneamente pelo Brasil, até a metade do século XIX. Com base em dados do Programa Nacional de Triagem Neonatal, estima-se que anualmente nasçam no Brasil, 3500 crianças com doença falciforme e cerca de 200.000 pacientes do traço falciforme, fato que indica a abordagem desta doença como problema de saúde pública (ADAM, 2001).

A síndrome falciforme é uma doença de caráter crônico, incurável embora tratável e que, geralmente, traz alto grau de sofrimento aos seus pacientes, que merecem atenção especial do ponto de vista médico, genético e psicossocial (PAIVA E SILVA, 1993).

As manifestações clínicas da anemia falciforme variam desde morte na infância até total ausência de sintomas com qualidade de vida praticamente normal. Estas manifestações estão diretamente relacionadas com a inibição da polimerização intracelular da HbS, a diminuição da intensidade da hemólise e da oclusão da microcirculação (FLEURY, 2007). A presença de outros tipos moleculares de hemoglobina, como a A₂ e a F, parece influenciar a polimerização da HbS. Alguns estudos demonstram que altos níveis de HbF estão relacionados com menor número de episódios de dor, além de uma melhor sobrevida de pacientes com anemia falciforme (VICARI, 2005).

O estudo dos polimorfismos gênicos pode ser utilizado com diferentes objetivos: para a determinação da origem unicêntrica ou multicêntrica de uma mutação, para discriminar eventos epistáticos, quando outros genes interferem na expressão fenotípica do gene mutante, e para definir o caminho de fluxo de um gene mutante. Quando os dados e mutações estão suficientemente consolidados, como no caso do grupamento do gene beta, o conhecimento a respeito da frequência e distribuição dos haplótipos pode ser útil no estudo da origem e evolução da raça humana (GALIZA NETO *et al.*, 2005).

O eritrócito constitui modelo celular adequado para o estudo dos efeitos de ERO, em virtude da sua simplicidade estrutural, acessibilidade e vulnerabilidade dos seus constituintes à oxidação (SILVA *et al.*, 2006). O estresse oxidativo representa um desequilíbrio entre a geração de ERO e a baixa concentração de antioxidantes na célula (MANFREDINI *et al.*, 2008). As hemoglobinopatias, tal como a anemia falciforme, apresentam eritrócitos mais predispostos aos ataques das espécies radicalares por produzirem maiores quantidades de ERO (FORMICA; REGELSON, 1995). O entendimento destes mecanismos oxidativos exarcebados na anemia falciforme é fundamental para a pesquisa de novas estratégias de conduta para melhorar a qualidade de vida destes pacientes.

O tratamento da anemia falciforme tem trazido, nos últimos dez anos, significativa melhora para o prognóstico dos seus pacientes. As investigações e o entendimento de alguns processos oxidativos desta doença levaram à descoberta de novas terapias. A introdução da hidroxiureia, por exemplo, teve impacto na qualidade de vida dos pacientes, reduzindo o número de crises vasooclusivas e de hospitalizações, o tempo de internação, a ocorrência de síndrome torácica e, possivelmente, de eventos neurológicos agudos (CANÇADO; JESUS, 2007). As possíveis explicações para estes benefícios estão relacionadas com o aumento da proporção de HbF, o que reduziria a polimerização da HbS (CHARACHES, 1995). Apesar de vários relatos de benefícios obtidos com a hidroxiureia, há registro de que, em pelo menos 25% dos pacientes, não ocorre o aumento da HbF. Além disso, são bem conhecidas as reações adversas pelo uso desta droga, como mielossupressão, perturbações gastrointestinais, erupções cutâneas, enxaquecas, bem como seu potencial teratogênico e carcinogênico (SILVA; SHIMAUTI, 2006).

Apesar da introdução de novas terapias nos últimos anos, a transfusão de eritrócitos tem sido recurso terapêutico cada vez mais utilizado, por ser mais segura e, sobretudo, por prevenir complicações graves. Estima-se que cerca de 20 a 30% dos pacientes com doença falciforme são mantidos em regime crônico de transfusões sanguíneas. Porém, esta prática desenvolve, inexoravelmente, sobrecarga de ferro após 10 a 20 unidades de concentrado de hemácias e, em poucos meses, concentrações hepáticas de ferro que conferem maior risco de complicações, tais como doença cardíaca e morte precoce (CANÇADO; JESUS, 2007).

Portanto, as terapias mais utilizadas no tratamento da anemia falciforme apresentam algumas limitações importantes, o que motiva o estudo de novas formas de tratamento para a doença. Os flavonoides são substâncias com propriedades antioxidantes ubiqüitariamente distribuídos nas plantas, sendo que o seu consumo tem sido associado ao efeito protetor cardiovascular e anti-oncogênico de certas dietas (SILVA; SHIMAUTI, 2006). São pigmentos naturais, que protegem o organismo dos danos causados por agentes oxidantes, não são produzidos pelo organismo humano, e podem ser obtidos somente através da alimentação ou na forma de suplementos (MARTINES-FLORES, 2002).

O projeto teve como objetivo estudar o possível efeito protetor de vários polifenóis, o que pode introduzir novas condutas e estratégias de tratamento que melhorem a sobrevida dos pacientes da anemia falciforme. Em estudos realizados anteriormente por este grupo de pesquisa (CHAVES; LEONART; DO NASCIMENTO, 2008), foi observada ação oxidante de *t*-BHP (1 a 5 mmoles/l) em eritrócitos SS e ações protetoras das vitaminas C e E contra o estresse oxidativo produzido. O efeito protetor das vitaminas C e E observado abre novas perspectivas para o seu emprego no doente com anemia falciforme. Sendo assim, este trabalho é uma continuidade de uma linha de pesquisa em andamento na UFPR.

No presente estudo, procurou-se associar aspectos moleculares da doença falciforme, pela determinação dos haplótipos da população falciforme paranaense atendida no HEMEPAR, com o estresse oxidativo, que reconhecidamente está presente na doença, tentando-se estabelecer um entendimento entre estes aspectos e a resposta à ação antioxidante de alguns flavonoides.

6.1 DETERMINAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DO “CLUSTER” DO GENE BETA

A anemia falciforme cursa como uma anemia hemolítica crônica e que devido a vários fatores, principalmente genéticos demonstra grande heterogeneidade clínica. Os haplótipos SEN, BEN, República Central Africana (CAR) ou BAN, Camarões e Árabe-Indiano comumente associados à mutação Hb β^s são denominados de acordo com a área geográfica onde são mais encontrados ou o grupo étnico onde foram originalmente descobertos (CABRAL, 2011).

A importância dos haplótipos da mutação β^s na evolução clínica dos pacientes com anemia falciforme foi determinada através das observações quanto ao surgimento e a intensidade das complicações de natureza orgânica e da curva de sobrevida dos pacientes, sugerindo melhores prognósticos para os pacientes dos haplótipos SEN e árabe-indiano e pior evolução clínica para os pacientes dos haplótipos BAN e BEN. Além disto, o estudo dos haplótipos permite melhor compreensão do surgimento da mutação β^s no mundo (GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2002)

Um dos objetivos do presente trabalho foi estabelecer a frequência dos haplótipos da anemia falciforme em pacientes atendidos no HEMEPAR, no Estado do Paraná. O Paraná é um estado conhecido por migrações de povos de origem europeia, principalmente italianos e poloneses, não sendo, portanto, um dos grandes pontos do desembarque de escravos, oriundos da África, no Brasil, no período colonial. Com a grande diversidade genética que a população brasileira apresenta, o perfil dos haplótipos é um dado importante para o entendimento da origem das mutações encontradas no Paraná.

Foram pesquisados 29 pacientes e, portanto, analisados 58 cromossomos. Foram encontrados 41 cromossomos com haplótipo BAN (70,8%), 15 BEN (25,8%) e 2 SEN (3,4%). Dos pacientes analisados, 11 eram heterozigotos para os haplótipos BAN e BEN (BAN/BEN) (38,0%); 15 eram homozigotos para o haplótipo BAN (BAN/BAN) (51,7%); 2, homozigotos para o haplótipo BEN (BEN/BEN) (6,9%); e 1 paciente, portador em homozigose para o haplótipo SEN (SEN/SEN) (3,4%).

A distribuição dos haplótipos em nosso estudo é semelhante às citadas em vários outros trabalhos já realizados no Brasil. O predomínio do haplótipo BAN em nossa população também foi visto em outros estados brasileiros, com exceção dos

estados da Bahia e do Ceará, onde o haplótipo BEN foi o mais comum. O achado do paciente SEN em nosso trabalho reflete a pequena incidência deste polimorfismo na população brasileira (Quadro 11).

QUADRO 11 - DISTRIBUIÇÃO DOS HAPLÓTIPOS GENÉTICOS DE PACIENTES PACIENTES DE ANEMIA FALCIFORME EM VÁRIOS ESTUDOS REALIZADOS NO BRASIL.

	Local	Número de pacientes	CAR	BEN	CAM	SEN	ATIP.
Costa <i>et al</i> (1984)	São Paulo(SP)	37	61,0%	38%			1,0%
Zago <i>et al</i> (1992)	São Paulo(SP)	37	66,2%	23%		1,3%	9,5%
Gonçalves <i>et al</i> (1994)	São Paulo(SP)	74	62,2%	33,8%			4,0%
Fleury (2007)	Rio de Janeiro(RJ)	74	54,0%	44,6%		1,4%	
Costa <i>et al</i> (1984)	Salvador (BA)	36	49,0%	51,0%			
Gonçalves <i>et al</i> (2003)	Salvador (BA)	80	48,1%	45,6%		0,7%	5,6%
Adorno <i>et al</i> (2004)	Salvador (BA)	80	46,2%	48,8%	1,9%	0,6%	0,6%
Adorno <i>et al</i> (2008)	Salvador (BA)	125	41,6%	55,2%	1,2%	0,4%	1,2%
Bezerra <i>et al</i> (2007)	Recife (PE)	74	81,1%	14,2%	0,8%		3,9%
Galiza Neto <i>et al</i> (2005)	Fortaleza (CE)	22	31,8%	43,2%		2,3%	
Silva <i>et al</i> (2009)	Fortaleza (CE)	34	66,2%	22,0%			11,8%
Pante de Sousa <i>et al</i> (1998)	Belém (PA)	30	67,0%	30,0%		3,0%	
Cardoso and Guerreiro (2006)	Belém (PA)	130	66,0%	21,8%	1,3%	10,9%	
Presente estudo	Curitiba (PR)	29	70,7%	25,8%		3,5%	

FONTE: ADAPTADO DE CABRAL (2011).

A identificação dos polimorfismos do gene β^s possibilita o estudo dos padrões culturais e migratórios dos povos africanos, afro-americanos e asiáticos. Nas Américas, o estudo dos haplótipos β^s tem contribuído para decifrar as intrincadas e complexas viagens que traziam os escravos negros da África para o novo continente entre os séculos 16 e 19 (JONES-LECOINTE *et al.*, 2008). É bem conhecido que o fluxo genético da codificação da HbS para as Américas provém quase que exclusivamente da África, com exceção de uma pequena fração trazida por imigrantes europeus. Como o gene β^s se encontra distribuído ampla e heterogeneamente por todas as regiões americanas, a determinação das frequências dos seus polimorfismos tem levado historiadores e antropólogos a estudar as raízes ancestrais deste gene anormal (ROMERO, 1998).

A trajetória dos negros africanos para o Brasil foi heterogênea, uma vez que o tráfico de escravos se desenvolveu ao longo de 300 anos, carreando escravos de quase toda a costa ocidental da África. Acredita-se que neste período entraram pelos portos da Bahia e do Rio de Janeiro, pelo menos 3,6 milhões de negros africanos. Por outro lado, a migração europeia e asiática para o Brasil também foi diversificada, destacando-se principalmente os imigrantes portugueses, italianos e espanhóis. Admite-se, portanto, que esses contingentes populacionais também

pacientes de alterações genéticas, contribuíram para a introdução de vários tipos de hemoglobinas variantes. Os processos miscigenatórios entre os diferentes povos que constituem a atual população brasileira ocorreram de forma gradual ao longo dos séculos, tornando-se abrangentes a partir do século 20 (NAOUM, 2000a).

Para o entendimento da origem das mutações encontradas na anemia falciforme em certa população, é importante a pesquisa de aspectos históricos, principalmente os relacionados ao tráfico de escravos. Um exemplo disto é a característica dos haplótipos na Jamaica. Historicamente, sabe-se que entre 1655 e 1807, chegaram ao país 75.000 escravos sendo que, 72% destes eram oriundos de aldeias do BEN; 10%, de regiões do SEN e; 17%, de aldeias denominadas BAN. Em Cuba, 42% dos africanos que lá chegaram eram originários da região ocidental centro-africana (haplótipo BEN) enquanto 54% eram de territórios denominados BAN. O Quadro 12 apresenta a frequência dos haplótipos em alguns países, o que pode auxiliar no entendimento da origem das mutações que ocorrem nestes lugares.

O tráfico de escravos africanos começou no Brasil por volta de 1550 e os principais pontos de entrada foram Salvador, Recife e Rio de Janeiro. Indivíduos oriundos da Nigéria e de Daomé (atualmente BEN) desembarcaram principalmente na Bahia, enquanto os originários das tribos BAN, capturados principalmente no Congo, Angola e Moçambique, foram enviados para Pernambuco, Minas Gerais e Rio de Janeiro (CABRAL, 2011). Este dado histórico pode explicar a maior incidência do haplótipo BEN, nos estudos realizados em Salvador e o predomínio do haplótipo BAN nas outras regiões brasileiras.

QUADRO 12 – PREVALÊNCIA (POR 100 HABITANTES COM A DOENÇA FALCIFORME) DOS HAPLÓTIPOS β^S EM DIVERSAS ZONAS GEOGRÁFICAS.

Local	CAR	BEN	CAM	SEN
Argélia		100%		
BEN		100%		
Quênia	98,3%			
Nigéria		97,1%		
SEN	1,8%	14%		83%
Grécia		>90%		
Portugal	43,8	12,5		25
Estados Unidos	25	60		10
Carolina do Sul (EUA)	40	17		43
Suriname	36	52		4

Existem poucos dados históricos sobre a migração dos escravos no estado do Paraná, o que limita a interpretação dos nossos resultados em relação à frequência dos haplótipos nos indivíduos pacientes de anemia falciforme estudados.

Acreditamos que o Paraná, como alguns estados brasileiros, não foi ponto de chegada principal para os escravos africanos, onde sua migração se deu por ciclos econômicos que ocorreram ao longo de 400 anos. Nossos resultados podem refletir a maior migração de escravos provindos do Rio de Janeiro, pela predominância do haplótipo BAN em nossa população.

6.2 HEMOGRAMA

Dados da literatura trazem como características laboratoriais da doença falciforme, anemia normocítica normocrômica grave, concentrações de hemoglobina variando entre 4 e 11 g/dl e elevada contagem de reticulócitos. Mesmo com o aumento da densidade das células falciformes, o CHCM permanece normal, principalmente se obtido por equipamentos que utilizam a impedância elétrica (BAIN, 2004; BEUTLER, 2006). A contagem de leucócitos é elevada, principalmente pelo aumento de granulócitos maduros, o que pode ser explicado por um desvio destas células dos compartimentos marginais para os circulantes. Esta elevação dos leucócitos fica mais evidente nas crises vaso-oclusivas. O aumento das contagens de plaquetas é achado comum, podendo ser explicado pelo sequestro esplênico reduzido ou ausente (LUKENS; LEE, 1998).

Os parâmetros hematimétricos médios dos pacientes do grupo SS estudados no presente trabalho apresentaram contagens de eritrócitos ($2,67 \pm 0,53$ milhões/mm³), dosagens da hemoglobina ($8,82 \pm 1,25$ g/dl) e de hematócrito ($26,5\% \pm 4,19$), menores do que os do grupo controle AA, os quais foram condizentes com os valores de normalidade descritos na literatura (Tabela 1). Os valores de VCM variaram entre 95,6 e 106,0 fl, refletindo tendência de elevação deste parâmetro nos pacientes estudados (grupo SS). As contagens de plaquetas foram significativamente mais elevadas no grupo SS, com diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (AA) (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Desta forma, os resultados obtidos confirmam o perfil hematológico esperado em pacientes de anemia falciforme, com exceção do aumento dos valores médios de VCM e da não elevação da contagem de leucócitos. Para a análise destes dados, deve-se aliar a informação de que a maioria dos pacientes do

grupo SS envolvidos em nosso estudo, utilizava a HU como principal forma de tratamento da doença. Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar a influência da HU sobre os parâmetros hematológicos. Bandeira *et al* (2004), analisando o efeito do uso da HU em pacientes da doença falciforme, verificou elevação tanto da concentração da hemoglobina fetal quanto do VCM após o início do tratamento. Steinberg *et al.* (2003), estudando irmãos pacientes de anemia falciforme, também observaram correlação entre o aumento da hemoglobina fetal e o VCM durante o tratamento destes pacientes com HU, justificando estas elevações pela ação da droga. O Quadro 13 apresenta alguns trabalhos nos quais se avaliou o comportamento do VCM na anemia falciforme, cujos resultados são apresentados como médias encontradas pelos autores.

QUADRO 13 – VALORES MÉDIOS E DESVIOS PADRÃO DO VCM EM ALGUNS TRABALHOS QUE AVALIARAM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME.

	VCM (fl)
Gonçalves, 2003*	88,4±10,0 fl
Bandeira <i>et al</i> , 2004	99,5±17,5 fl
Fleury, 2007*	91,3±9,29*
Neto, 2005*	105,5±10,0*
Presente trabalho	100,89±13,67

NOTA: VCM (fl) = VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO EM FENTOLITRO

Neste trabalho, estratificou-se o grupo SS em seus haplótipos, de acordo com os resultados da análise molecular. Com relação aos parâmetros hematimétricos, o comportamento do grupo SS não apresentou diferenças significativas em relação a estes subgrupos. A contagem de eritrócitos, a concentração de hemoglobina e o hematócrito em todos os haplótipos foram significativamente menores que no grupo AA, com exceção do paciente SEN/SEN. A elevação do VCM diferiu de forma significativa entre o grupo AA e os haplótipos BAN/BEN e SEN/SEN. Em relação à contagem de plaquetas, o haplótipo BAN/BEN foi o único grupo que apresentou diferença significativa em relação ao grupo AA (Figura 43).

O paciente portador do haplótipo SEN apresentou VCM=123 fl, hemoglobina=11,8 g/dl e hematócrito=35,1%, valores mais altos do que as médias encontradas nos outros haplótipos. Além disto, a contagem de plaquetas deste paciente foi menor (294.000 plaquetas/mm³), apresentando um quadro hematológico mais favorável. Este resultado deve ser avaliado com ressalvas, por ser o perfil de um único paciente. As médias dos parâmetros hematológicos encontrados nos outros haplótipos (BEN/BEN, BEN/BAN, BAN/BAN) são muito semelhantes com os dados de outros estudos, com exceção novamente ao VCM, que pode ser explicado pela ação da HU. O Quadro 14 apresenta as médias e o desvio padrão dos parâmetros hematológicos encontrados em dois estudos semelhantes ao presente trabalho.

QUADRO 14 – VALORES MÉDIOS E DESVIOS PADRÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS EM ALGUNS TRABALHOS EM QUE SE AVALIOU PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME EM SEUS HAPLÓTIPOS.

		Eritrócitos (milhões/mm ³)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	VCM (fl)
Gonçalves, <i>et al.</i> (2003)	BAN(n=17)	N.A.	7,88 ±0,82	23,6±2,9	86,3±8,1
	BEN(n=17)	N.A.	8,15± 1,89	24,4±5,4	90,5±12,3
	BEN/BAN(n=37)	N.A.	8,79 ±1,79	26,0±5,8	86,7±9,7
Fleury (2007)	BAN(n=16)	2,65± 0,52	7,94± 1,21	23,5±3,5	89,2 ±8,13
	BEN(n=9)	2,82± 0,64	8,19± 0,79	24,4±2,6	89,0± 14,4
	BEN/BAN(n=47)	2,54± 0,45	7,81± 1,35	23,0±3,7	91,1± 7,8
Presente trabalho	BAN(n=15)	2,74±0,62	8,53±1,03	26,1±3,83	97,4±14,4
	BEN(n=2)	2,39±0,79	8,60±2,82	25,1±8,69	105,0±1,4
	BEN/BAN(n=11)	2,59±0,38	8,97±1,01	26,5±3,61	102,8±12,4

NOTA: N.A.= NÃO ANALISADO.

6.3 HEMOGLOBINA FETAL

O interesse pelo estudo da HbF na anemia falciforme teve início há cerca de 60 anos, quando Janet Watson confirmou que crianças pequenas portadoras da doença tinham sintomas mais brandos e menor grau de deformação de seus eritrócitos, quando estes eram comparados aos eritrócitos de suas mães. A autora atribuiu estas observações à alta concentração de HbF. Em estudos sobre a HbS, demonstrou-se que esta não interage com a HbF, o que diminui a intensidade do processo de polimerização. A HbF, assim, é considerada um modulador das características clínicas e hematológicas da anemia falciforme (AKINSHEYE, I *et al.*,

2011). A evidência bioquímica de que HbF é um potente inibidor do processo de polimerização da forma desoxigenada da HbS é amplamente justificada pelas características clínicas de alguns pacientes. Homozigotos para a HbS, originários da península arábica e de algumas tribos da Índia, que possuem altas concentrações de HbF, apresentam poucas manifestações clínicas (EPSTEIN, 1997).

A HbF é composta por duas cadeias polipeptídicas α e duas cadeias γ . As cadeias γ são codificadas por dois genes quase idênticos (HBG1 e HBG2) dentro do “cluster” do gene beta que diferem entre si, pela determinação da presença do aminoácido glicina ($^G\gamma$) ou alanina ($^A\gamma$) na posição 136 da cadeia globínica (γ 136). O efeito contra o processo de polimerização da HbF está relacionado com a presença dos resíduos glicina na posição 87 (γ 87) e do ácido aspártico na posição 80(γ 80) na cadeia γ (AKINSHEYE, I. *et al.*, 2011).

Altas concentrações de HbF foram associadas com redução das crises dolorosas, menor incidência de necrose em membros inferiores e menor taxa da síndrome torácica, reduzindo a gravidade clínica da doença. Por outro lado, não foi estabelecida correlação entre o aumento da concentração da HbF e a menor incidência do priapismo, albuminúria, controle da pressão sanguínea e vasculopatias (AKINSHEYE, I. *et al.*, 2011).

Os valores médios de HbF encontrados para os 29 pacientes com anemia falciforme, que participaram deste estudo, foram de $10,9 \pm 8,12\%$. Analisando o perfil da HbF, nos respectivos haplótipos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 2). Estes resultados divergem de inúmeros dados da literatura que correlacionam as concentrações de HbF com haplótipos específicos. Por exemplo, o haplótipo BAN foi relacionado a concentrações de HbF abaixo de 5%, enquanto o haplótipo BEN apresentou concentrações intermediárias, entre 5 e 15%, o que levou a se estabelecer correlação entre os haplótipos da anemia falciforme, os níveis de HbF e a heterogeneidade clínica encontrada na doença (ADORNO, 2008).

Pacientes dos haplótipos SEN e árabe-indiano possuem o polimorfismo C-T na posição 158, acima da região promotora do gene γ . Este sítio de restrição, chamado XmnI, é associado a altas concentrações de HbF e de cadeias $^G\gamma$. Pacientes com anemia falciforme, dos haplótipos BAN e BEN não possuem este

sítio, o que poderia explicar diferenças de concentrações de HbF entre estes haplótipos (AKINSHEYE, I *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram médias semelhantes de HbF entre os haplótipos BAN/BAN (média de 9,8%), BEN/BEN (média de 9,6%) e BAN/BEN (média de 11,2%) com elevação acentuada no haplótipo SEN/SEN (média de 38,3%). Este perfil deve ser analisado sob o ponto de vista da influência da HU sobre os nossos resultados. A HU é um agente quimioterápico bastante conhecido e utilizado para o tratamento de síndromes mieloproliferativas, como leucemia mieloide crônica e policitemia vera. Sua principal função encontra-se no bloqueio da síntese de DNA através de inibição da ribonucleotídeo redutase, mantendo as células em fase S (BANDEIRA, 2004).

Bandeira *et al* (2004), analisando o efeito da hidroxiureia em pacientes com anemia falciforme demonstraram uma elevação do nível da HbF de $12,2 \pm 6,7\%$ para $17,6 \pm 6,0\%$, comprovando a eficácia da droga. Em estudo similar, com 20 pares de irmãos (40 pacientes) com anemia falciforme demonstrou-se que a hidroxiureia além do aumento da HbF eleva também de maneira proporcional o VCM (STEINBERG *et al.*, 2003).

Neto e Pitombeira (2002) analisaram a frequência dos haplótipos em pacientes com anemia falciforme no estado do Ceará. Neste estudo, pacientes do haplótipo BAN e BEN apresentaram médias de HbF menores do que os de haplótipo SEN. Fleury (2007) demonstrou médias de HbF menores para o haplótipo BAN/BAN em relação aos haplótipos BAN/BEN e BEN/BEN. Neste trabalho, o perfil apresentado pela HbF foi concordante com o relatado pela literatura (ROMERO, 1998; ASCHLEY-KOCH, 2000; NAOUM, 2000b; AKINSHEYE, I *et al.*, 2011).

Gonçalves *et al.* (2003) determinaram a frequência dos haplótipos de 80 pacientes com anemia falciforme tratados no HEMOBA, em Salvador, Bahia. Estratificando os pacientes de acordo com as concentrações de HbF, valores acima de 10% foram encontrados em pacientes dos genótipos BAN/BEN (12 pacientes); BAN/BAN (4 pacientes), BEN/BEN (7 pacientes), tendo sido encontrados ainda, pacientes do haplótipo BAN/BAN com níveis de HbF acima de 15%. Estes resultados exemplificam a heterogeneidade da concentração da HbF entre os haplótipos, o que foi também verificado em nossos resultados.

Analisando nossos resultados de maneira individual, verificamos que nem todos os pacientes respondem satisfatoriamente à hidroxiureia, com relação à

elevação da HbF. No haplótipo BEN/BAN, 4 pacientes apresentaram HbF abaixo de 5%, enquanto que 3 pacientes homozigotos para o haplótipo BAN demonstraram este perfil. Por outro lado, 7 pacientes (quase 50% dos pacientes BAN/BAN) apresentaram concentrações de HbF acima de 10%. Todos os pacientes recebiam doses de HU variando entre 0,5 a 1 g/dia de HU. Esta variabilidade de comportamento, em relação à resposta ao tratamento, demonstra a possibilidade da existência de outros mecanismos de controle da concentração de HbF como, por exemplo, outros sítios genéticos reguladores de sua produção.

Os trabalhos publicados por Gonçalves *et al* (2003), Neto e Pitombeira (2005) e Fleury (2007) não relatam o uso da hidroxiureia nos pacientes estudados. Desta maneira, fica limitada a análise de seus resultados. Atualmente, com a melhoria das técnicas moleculares, outros mecanismos de controle da expressão dos genes γ foram descobertos, modificando o entendimento sobre a distribuição da HbF entre os haplótipos da anemia falciforme, o que poderia explicar a variabilidade dos resultados apresentados na literatura. Embora as concentrações basais de HbF se correlacionem com a gravidade clínica da anemia falciforme, esta relação não é tão simples. Alguns pacientes com concentrações elevadas de HbF apresentam complicações graves, enquanto outros, com concentrações menores, apresentam curso clínico favorável (GUALANDRO, 2009).

A grande variação nas concentrações de HbF sugere que existam outros moduladores da expressão do gene γ , além do XmnI, que são denominados como *quantitative trait loci* (QTL)(AKINSHEYE, I. *et al.*, 2011). Os iniciadores dos genes que regulam a produção de hemoglobina dependem de complexas interações com fatores de transcrição, proximidade com o *locus control region* (LCR) e fatores de transcrição específicos para a linhagem eritróide, que podem interagir com regiões promotoras do gene (ADORNO, 2008). Recentemente, foram descritos três grandes *loci* que controlam a variação genética da HbF. O primeiro é o polimorfismo já conhecido na posição -158 da região promotora do gene γ ; o segundo é um polimorfismo localizado no braço longo do cromossomo 6 localizado entre os genes HBS1L e MYB e o terceiro é uma variante dentro do íntron 2 do fator de transcrição BCL11A, que reduz a expressão deste gene (WILBER; NIENHUIS; PERSONS, 2011). A HbF na anemia falciforme pode variar entre 1 a 30% e estes polimorfismos

são responsáveis por mais de 50% dos mecanismos que controlam estas variações (REES, 2010).

O BCL11A tem como função regular o silenciamento do gene γ , o que foi comprovado pelo aumento da produção de HbF quando este fator foi bloqueado. A presença de polimorfismos ou *single nucleotide polymorphisms* (SNP) neste gene é fortemente associada com o aumento da HbF, sendo que estes SNP são considerados moduladores da gravidade da doença. Por outro lado, SNP nas regiões intergênicas HBS1L e MYB também são correlacionados ao controle dos níveis de HbF (LETTRE *et al.*, 2008). Baixos níveis de MYB são associados com redução da expansão e da diferenciação eritróide, o que pode afetar a expressão da HbF (AKINSHEYE, I. *et al.*, 2011).

Além disto, a concentração da HbF não controla todas as complicações da anemia falciforme, o que pode ser explicado pela origem dos eventos fisiopatológicos da doença. Alguns estudos epidemiológicos sugerem que complicações relacionadas à vasooclusão e à viscosidade sanguínea têm relação com a HbF, enquanto complicações associadas com a intensidade da hemólise, são menos influenciadas pela HbF (AKINSHEYE, I. *et al.*, 2011).

Desta forma, a influência da concentração da HbF na anemia falciforme deve ser interpretada não só por sua relação com os haplótipos, mas também por outros fatores genéticos, e ainda pela influência de fatores ambientais como, por exemplo, aqueles relacionados aos níveis sócio-econômico e cultural que, indubitavelmente, influenciam no curso da doença (GUALANDRO, 2009). Os resultados apresentados neste trabalho certamente refletem o efeito do emprego da terapia com HU sobre a concentração de HbF. Apesar de impossibilidade de uma melhor análise, o único paciente com homozigose para o haplótipo SEN apresentou características hematológicas e concentração de HbF mais favoráveis ao curso clínico sem grandes complicações, dados condizentes com outros relatos encontrados na literatura (ROMERO, 1998).

6.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

A doença falciforme é caracterizada por um estresse oxidativo crônico causado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a atividade de enzimas antioxidantes (CHO *et al.*, 2010). Embora a fisiopatologia central da doença esteja relacionada à polimerização da hemoglobina S e à falcização dos eritrócitos sob condições de desoxigenação, cada vez mais aumentam as evidências de que a anemia falciforme é um estado inflamatório caracterizado por uma maior ativação endotelial (KAUL *et al.*, 2006). A disfunção endotelial tem sido associada ao processo inflamatório, à grande produção de ERO e ERN e ao aumento da adesão celular aos tecidos (RUSANOVA *et al.*, 2010).

É descrito que o mecanismo de formação de O_2^- , via desoxigenação da hemoglobina (NUR *et al.*, 2011), é cerca de 1,7 vezes maior nos eritrócitos falciformes, o que poderia explicar a suscetibilidade destas células ao estresse oxidativo (ASLAN; THORNLEY-BROWN; FREEMAN, 2000). Os resultados apresentados neste trabalho não mostram este aumento na produção de ERO nos pacientes do grupo SS em seu estado basal e, apesar de não apresentarem diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo AA ($120,6 \pm 47,9$ UF/gHb), os valores médios de ERO no grupo SS ($102,3 \pm 47,9$ UF/gHb) foram ainda menores.

Com relação ao processo de formação de ERO induzida pelo agente oxidante *t*-BHP, foi verificado aumento significativo, sem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos. O processo oxidativo induzido por *t*-BHP em eritrócitos se faz pela rápida oxidação de GSH por GSH-Px e pela reação entre *t*-BHP e hemoglobina, com formação de radicais livres e metahemoglobina (DOMANSKI; LAPSHINA; ZADODNIK, 2005). Chaves *et al.* (2008) demonstraram, através da ação do *t*-BHP, maior suscetibilidade à oxidação dos eritrócitos de indivíduos pacientes de HbS (AS e SS), pelo aumento significativo da formação de corpos de Heinz, metahemoglobina e hemólise, além da depleção da GSH, em relação aos eritrócitos de indivíduos normais. No entanto, os resultados obtidos não mostraram esta maior tendência à oxidação, pois a formação de ERO por *t*-BHP foi semelhante nos dois grupos (Tabela 3).

Em todas as concentrações testadas (30, 50 e 100 μ moles/l), observou-se atividade protetora de quercetina, rutina, hesperidina e miricetina contra a ação oxidante do *t*-BHP (75 μ moles/l), sendo que a quercetina e a rutina apresentaram os melhores resultados e comportamentos semelhantes, ou seja, a partir de 50 μ moles/l não apresentaram diferenças significativas em relação ao estado basal, em eritrócitos dos grupos AA e SS (Tabela 3).

Dos flavonoides testados, a hesperidina apresentou o pior comportamento em relação à inibição da formação de ERO. Apesar da produção de ERO ter diminuído em todas as concentrações testadas após a adição do *t*-BHP, as médias em UF/g Hb foram estatisticamente maiores quando comparadas às obtidas com os outros polifenóis testados. A miricetina demonstrou atividade antioxidante semelhante da quercetina e da rutina, porém apenas quando se empregou a concentração de 100 μ moles/l.

A ação antioxidante dos flavonoides se deve à combinação de sua atividade quelante, via estrutura orto-dihidroxi e de sua capacidade de seqüestrar radicais livres (MORIDANI *et al.*, 2003). Este sequestro ocorre em três estágios: formação do íon superóxido, geração de radicais hidroxi pela reação de Fenton e formação de radicais lipídicos, mecanismos que podem diminuir a peroxidação lipídica (RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G., 1996).

Em vários estudos, tem sido demonstrado o efeito protetor da quercetina contra danos oxidativos *in vitro*, sendo que a preservação da integridade da membrana eritrocitária tem sido apontada como o principal efeito, principalmente pela sua facilidade em penetrar na célula (HAPNER; DEUSTER; CHEN, 2010). A presença do grupo catecol no anel B da quercetina e da rutina é essencial para o sequestro de radicais livres e para sua atividade antioxidante. Porém, o grupo rutinosídeo, na posição 3, pode prejudicar a ação quelante da rutina em relação à da quercetina (CESQUINI *et al.*, 2003). Neste trabalho, os resultados não mostram diferenças significativas de eficiência entre estes polifenóis. Barreca *et al* (2009) demonstraram que a quercetina e a rutina apresentam maior capacidade de sequestrar radicais livres quando comparadas com outros flavonoides, como hesperidina, neohesperidina e hesperitina, o que também foi observado em nossos resultados

Quando o grupo SS foi analisado em seus diferentes haplótipos, o comportamento no estado basal ou pela ação de *t*-BHP, mesmo sob proteção dos

flavonoides, não apresentou variações significativas em relação aos resultados obtidos no grupo SS total, ou seja, foi verificado aumento na produção de ERO pela ação do agente oxidante e proteção pelos polifenóis (Figuras 44 a 47).

O interesse do uso de antioxidantes no tratamento da anemia falciforme se deve ao fato de muitos deles serem facilmente encontrados na natureza, contidos em vegetais acessíveis e de baixo custo, o que é fator relevante, pois frequentemente a incidência da anemia falciforme se dá em países de recursos econômicos limitados (NUR *et al.*, 2011), além de ser mais frequente em indivíduos afro-descendentes (WATANABE *et al.*, 2008), que em geral apresentam piores condições sócio-econômicas.

É importante ressaltar que todos os pacientes com anemia falciforme que participaram deste estudo, utilizavam a HU como principal agente terapêutico. Assim, não foi possível compor um grupo SS sem esse tipo de tratamento. Koneié (2011) demonstrou que a HU possui atividade sequestrante de radicais livres em reações com 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), o que poderia explicar nossos resultados, quando a quantidade de ERO tanto no estado basal quanto sob a ação do *t*-BHP foram semelhantes entre os grupos AA e SS (Tabela 3). Portanto, não se pode descartar o efeito da HU sobre os resultados obtidos.

É bem conhecido que a administração de hidroxiureia em pacientes com anemia falciforme reduz o número de crises vasooclusivas e parece prolongar a expectativa de vida destes pacientes, o que se atribui, principalmente, a sua habilidade em aumentar a síntese de hemoglobina fetal, a qual parece inibir a polimerização da hemoglobina S. A HU aumenta a produção de GMPc, com consequente transcrição do gene λ (CHO *et al.*, 2010). A indução da síntese de hemoglobina fetal pela HU resulta em diminuição da hemólise, limitando a produção de ERO e o sequestro do óxido nítrico. A HU pode, ainda, aumentar a capacidade antioxidante pelo aumento da expressão da glutathione peroxidase 1 (NUR *et al.*, 2011). Esta sequência de eventos, descrita na literatura, sugere que pode haver a influência da HU, quando empregada como agente terapêutico, minimizando a formação de ERO em pacientes de anemia falciforme.

Analisando-se o comportamento protetor contra a oxidação, apresentado por quercetina, rutina e miricetina na concentração de 30 μ moles/l, encontrou-se menor efeito destes flavonoides em eritrócitos do grupo controle em relação aos do grupo SS, o que corrobora a ideia de que eritrócitos de pacientes de anemia falciforme

possam apresentar efeito adicional no sequestro de ERO, pela atividade terapêutica da hidroxiureia.

Os resultados obtidos neste trabalho podem contribuir para melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na terapia da anemia falciforme, sugerindo que o uso de HU, concomitantemente a uma ingesta contínua de flavonoides, pode desencadear um efeito benéfico adicional no curso clínico da doença. Estudos mais completos sobre a farmacocinética destes polifenóis se fazem necessários para se definir a sua ação *in vivo* e a ingesta necessária para se obter efeito terapêutico ou nutracêutico.

Desta forma, o estudo dos flavonoides e sua introdução em terapias convencionais é um campo promissor, porém sua utilização depende de um conhecimento aprofundado, principalmente das propriedades físico-químicas dos flavonoides, o que pode contribuir para a sua correta inclusão em esquemas terapêuticos.

6.5 HEMÓLISE

Com o objetivo de estudar os efeitos dos flavonoides sobre a membrana eritrocitária de indivíduos normais e de pacientes com anemia falciforme, considerando-se seus haplótipos, utilizamos como agente hemolisante o 2,2'-azobis (2-metil-propionamida) dihidroclorato (AAPH). Pela sua suscetibilidade à peroxidação lipídica, os eritrócitos são usados como modelo para avaliação do dano oxidativo em biomembranas. Os eritrócitos são facilmente atacados por radicais livres pela presença de grandes quantidades de ácidos graxos em sua membrana e pela sua capacidade de transporte de oxigênio, que são potentes promotores de ERO. A exposição dos eritrócitos a condições oxidativas por sucessivas reações mediadas pelos radicais livres, leva à hemólise (MARTINEZ *et al.*, 2012).

Pela conhecida diferença de resistência osmótica entre eritrócitos normais e falciformes, os resultados de porcentagem de hemólise deste trabalho não se referem à hemólise basal e nem se utilizou como parâmetro de hemólise total, a produzida quando os eritrócitos eram suspensos em água, como em trabalhos anteriores (FURMAN, 2011). Para efeitos de comparação, considerou-se como

100% de hemólise, aquela produzida pelo agente oxidante (AAPH), analisando-se a ação protetora conferida pelos flavonoides. Os resultados foram expressos pela porcentagem de hemólise produzida nos respectivos tratamentos.

Em comparação com o grupo AA, o grupo SS demonstrou maior suscetibilidade oxidativa frente ao AAPH, ao se analisar o efeito protetor dos flavonoides estudados ($p < 0,05$) (Figura 48). Em relação ao grau de inibição da hemólise, quercetina, rutina e miricetina apresentaram resultados semelhantes. No grupo AA, estes polifenóis inibiram a hemólise em cerca de 60%, na concentração de 50 $\mu\text{moles/l}$ e; na ordem de 80%, na concentração de 100 $\mu\text{moles/l}$. A inibição conferida pela hesperidina foi menor, de cerca de 40 e 60%, respectivamente, nas mesmas concentrações, porém sem diferenças estatisticamente significativas.

No grupo SS, a quercetina e a rutina apresentaram graus de inibição de hemólise de aproximadamente 40 e 70%, nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{moles/l}$, respectivamente. A miricetina foi menos eficiente, reduzindo a hemólise em 40 e 60% nas duas concentrações testadas, enquanto a hesperidina apresentou o mesmo grau de proteção contra a hemólise, reduzindo-a em aproximadamente 40% em ambas as concentrações. Ao se subdividir o grupo SS em seus haplótipos, não houve diferenças estatisticamente significativas destes em relação ao grupo AA, de um modo geral (Figuras 49). As únicas exceções observadas foram as diferenças em relação às porcentagens de hemólise obtidas em presença da miricetina (50 $\mu\text{moles/l}$) e da hesperidina (100 $\mu\text{moles/l}$), porém apenas em eritrócitos de pacientes do haplótipo BAN/BAN.

Analisando-se os flavonoides individualmente, a miricetina na concentração de 50 $\mu\text{moles/l}$, inibiu a hemólise em aproximadamente 50% em todos os haplótipos, exceto no paciente do haplótipo SEN/SEN, no qual foi verificada proteção de 75%. Na concentração de 100 $\mu\text{moles/l}$, a inibição da hemólise foi maior (60%), sendo que no paciente SEN/SEN, o nível de proteção foi próximo a 80%.

A rutina e a quercetina, na concentração de 100 $\mu\text{moles/l}$, apresentaram um grau de inibição da hemólise semelhante nos haplótipos BAN/BAN, BAN/BEN e BEN/BEN (aproximadamente 70 %). Porém, na concentração de 50 $\mu\text{moles/l}$, a rutina apresentou pequeno efeito anti-hemolítico no haplótipo BEN/BEN (30%) em relação aos outros haplótipos, sendo menos eficiente que a quercetina nesta concentração, para este referido haplótipo. Este comportamento deve ser analisado considerando-se o pequeno número de pacientes BEN/BEN no presente estudo.

Um dos importantes parâmetros relacionados com o estado funcional e estrutural da membrana eritrocitária é a sua fluidez. Os flavonoides possuem ação sobre a membrana eritrocitária por aumentar sua rigidez, o que pode afetar a amplitude da peroxidação lipídica. Estudos sugerem que o aumento da rigidez da membrana impede a difusão dos radicais livres, reduzindo a cinética de suas reações com consequente redução da oxidação lipídica. A capacidade dos flavonoides em ligar-se e interagir com proteínas polares da membrana fosfolipídica sugere que estes compostos mantêm a integridade da membrana por prevenir o acesso de moléculas deletérias nas regiões hidrofóbicas da bicamada lipídica, bem como por acumular-se na superfície da membrana, tanto na sua face interna, como na externa (MARTINEZ *et al.*, 2012).

A peroxidação lipídica causada pelo AAPH é caracterizada pela formação de radicais livres que atacam a lado externo da membrana eritrocitária. Os radicais hidrofílicos gerados pelo AAPH parecem não atuar nas camadas mais internas da membrana eritrocitária, visto que estudos demonstraram a preservação das banda 1 e 2, após a ação do AAPH (YANG *et al.*, 2006). A ação protetora dos flavonoides na presença do AAPH sugere que estes impedem de alguma forma a ação destes radicais na membrana eritrocitária. A incorporação de antioxidantes na bicamada lipídica altera sua organização, com grande alteração nas cadeias acil, aumentando a rigidez da membrana, o que poderia explicar o efeito anti-hemolítico destes compostos (MARTINEZ *et al.*, 2012).

Olchowik (2012), utilizando HClO^\cdot e ONOO^\cdot como agentes iniciadores da hemólise, verificou a ação antioxidante de taninos oriundos de uvas sobre a hemólise. Estes agentes oxidantes são fontes importantes de ERO e ERN e levam ao desarranjo estrutural do eritrócito com consequente hemólise. Foi verificado que compostos polifenólicos ligam-se mais à superfície dos eritrócitos do que a estruturas intracelulares, formando complexos que servem como potentes bloqueadores de ERO e ERN.

Além disto, os flavonoides podem causar alterações na forma dos eritrócitos. A formação de equinócitos e de acantócitos em contato com os flavonoides pode comprovar que o principal local de ação dos polifenóis seja a porção externa da membrana. Em estudos recentes, sugere-se que os flavonoides previnam o acesso dos radicais peroxil à proteína de membrana banda 3 (MARTINEZ *et al.*, 2012).

A menor eficiência da hesperidina em prevenir hemólise, verificada em relação aos outros flavonoides estudados, é concordante com dados publicados por Barreca *et al.* (2009). Estes autores, ao estudarem o efeito anti-hemolítico de vários flavonoides, observaram que a quercetina e a rutina apresentaram maior atividade sequestradora de radicais livres do que a hesperidina. Estas diferenças de ação antioxidante podem ser explicadas pela estrutura química destes compostos. A presença de um açúcar no anel A da estrutura básica dos flavonoides (carbono 7) (Figura 64) pode levar à diminuição do efeito antioxidante que alguns polifenóis apresentam. Por exemplo, a hesperidina é a forma glicada da hesperitina, que por sua vez atua como agente oxidante na presença de H_2O_2 e Fe^{+2} . A presença do glicosídeo no anel A, como ocorre na hesperidina, proporciona o efeito antioxidante a este flavonoide em relação à hesperitina, porém, quando comparado a compostos que possuem grupos hidroxil e dupla ligação no anel C, como observado na quercetina, seu efeito protetor é significativamente menor (BARRECA *et al.*, 2009).

6.6 TBARS

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) se referem à quantificação indireta do malondialdeído (MDA) e de outros aldeídos resultantes da peroxidação lipídica, e são consideradas ótimos marcadores do estímulo pró-oxidante (JUNIOR, 2012). O MDA é um produto secundário da peroxidação lipídica, derivado da β -ruptura de ácidos graxos, como os ácidos linoleico e araquidônico, e que pode ser medido livre, utilizando-se o ácido tiobarbitúrico (VASCONCELOS, 2007).

Com base nos resultados obtidos pela determinação do TBARS, pode-se observar maior tendência oxidativa dos eritrócitos falciformes em relação aos eritrócitos normais. No estado basal, não houve diferenças significativas entre os grupos SS e AA, porém, quando estimulados pelo agente oxidante testado, o *t*-BHP, a média de formação de TBARS foi aproximadamente duas vezes maior nos eritrócitos do grupo SS em comparação aos do grupo AA. Tanto em eritrócitos normais quanto nos falciformes, a exposição ao *t*-BHP leva à formação de metahemoglobina e hemicromos, causando a peroxidação lipídica na membrana

eritrocitária e aumentando, assim, a quantidade do complexo hemoglobina-membrana (CESQUINI *et al.*, 2003). Todos os polifenóis testados apresentaram algum efeito protetor em relação à formação de TBARS, nos grupos AA e SS (Tabela 5). Esta ação parece estar diretamente ligada à estrutura química destes compostos. A Figura 64 apresenta a estrutura básica dos flavonoides, o que é importante para o entendimento da relação estrutura-atividade em relação à proteção contra a peroxidação lipídica.

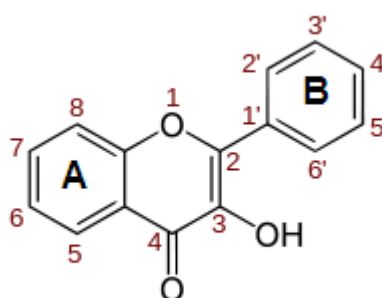


FIGURA 64 – ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONOIDES.

Para a inibição da peroxidação lipídica, é fundamental que o agente protetor seja um eficiente sequestrador de radicais livres, o que está relacionado ao número de substituições no anel B da estrutura dos flavonoides (COTELLE, 1996) (Figura 64). Substituições hidroxil nas posições 3', 4' e 5' são características importantes para a proteção quanto à formação do MDA. Cotelle (1996), analisando o efeito antioxidante de 24 polifenóis, verificou que compostos com estas três substituições eram mais eficientes na prevenção da peroxidação lipídica do que compostos com apenas duas. Analisando os compostos polifenólicos testados em nosso estudo, observamos que a miricetina apresenta estas três substituições, o que a princípio traria a este composto um maior poder antioxidante em relação aos outros três flavonoides. No entanto, os resultados obtidos não demonstram esta relação. Observando-se os valores encontrados para TBARS, o flavonoide que apresentou os menores valores, ou seja, que melhor protegeu contra a formação de TBARS, foi a quercetina, com $83,6 \pm 53,6$ e $57,58 \pm 29,1$ nmoles/gHb, respectivamente para concentrações de 50 e 100 nmoles/l, para o grupo AA, $255,3 \pm 172,8$ e $149,6 \pm 144,6$ nmoles/gHb, para as referidas concentrações, para o grupo SS. A rutina e a miricetina apresentaram comportamento muito semelhante, principalmente na concentração de 100 μ moles/l. A hesperidina não apresentou diferenças de ação

antioxidante ao se comparar as concentrações analisadas e, comparativamente, foi o composto menos eficiente na proteção à formação de TBARS (Tabela 5).

Cesquini *et al.* (2003) demonstraram que a quercetina 30 $\mu\text{moles/l}$, foi capaz de inibir em 53% a formação de TBARS em eritrócitos falciformes, após a ação do *t*-BHP, enquanto a rutina 100 $\mu\text{moles/l}$, providenciou inibição de apenas 20%. Neste trabalho, comparativamente, observou-se inibição da peroxidação lipídica por ação da quercetina em cerca de 30% (50 $\mu\text{moles/l}$) e de 60% (100 $\mu\text{moles/l}$) nos eritrócitos do grupo SS; e de 50 e 70%, respectivamente, para as mesmas concentrações, em eritrócitos normais. Ao se testar a rutina na concentração de 100 $\mu\text{moles/l}$, a inibição foi de 25% no grupo SS e de 50% em eritrócitos normais. Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho foram concordantes, com valores muito semelhantes aos resultados de Cesquini *et al.* (2003).

Abdallah (2011), utilizando o inseticida LTC (lambda-cihalotrina) como agente oxidante em eritrócitos normais, verificou que a associação de quercetina 10 $\mu\text{moles/l}$ e ácido caféico 20 $\mu\text{moles/l}$ foi capaz de inibir a formação de TBARS em 62%. Afanas'Ev *et al.* (1989), estudando vários iniciadores da peroxidação lipídica em eritrócitos verificou que, tanto a quercetina quanto a rutina, possuem efeito antioxidante, porém a quercetina foi mais eficiente do que a rutina nestes sistemas. A habilidade em inibir os radicais livres provavelmente ocorre de três formas: na interação com o íon superóxido; na prevenção da formação de radicais hidroxil e, finalmente, na proteção da peroxidação lipídica (AFANAS'EV *et al.*, 1989).

Lopez-Revuelta *et al.* (2006), utilizando o *t*-BHP na concentração de 2 mmoles/l , a mesma utilizada no presente trabalho, também observaram maior eficiência da quercetina em relação à rutina. De acordo com estes autores, a quercetina 1 mmol/l inibiu a formação de TBARS em 80% enquanto a rutina, na mesma concentração, apresentou 60% de proteção contra a peroxidação lipídica. O mesmo grupo de pesquisadores publicou resultados semelhantes, quando comparou a ação antioxidante da quercetina com o butilato de hidroxianisol (BHA) (SÁNCHEZ-GALLEGO, 2011). Analisando-se a peroxidação lipídica em microssomos hepáticos de ratos, pela ação de íons de ferro, a miricetina foi mais eficiente do que a quercetina quanto aos seus efeitos protetores (LAUGHTON, 1989). Algumas variações nos resultados encontrados na literatura poderiam ser explicadas pelas diferentes metodologias para a detecção do TBARS e as diferentes formas de iniciação da peroxidação lipídica.

Analisando os resultados obtidos neste estudo para TBARS nos subgrupos referentes aos diferentes haplótipos da anemia falciforme, os eritrócitos destes pacientes demonstraram a mesma tendência oxidativa. Os valores obtidos para TBARS, pela ação do *t*-BHP, nos haplótipos BEN/BAN e BAN/BAN foram aproximadamente duas vezes maiores e; no haplótipo BEN/BEN, três vezes maiores; em comparação aos encontrados no grupo AA ($p < 0,05$). Enquanto isso, o paciente portador do haplótipo SEN/SEN apresentou o menor valor entre os grupos, não apresentando diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo AA. Analisando a influência dos haplótipos sobre o estresse oxidativo da anemia falciforme, Santos *et al.* (2012) não observaram diferenças significativas nos níveis de MDA entre os haplótipos de 47 pacientes.

Com relação à ação dos flavonoides, analisando-se os valores encontrados, a hesperidina apresentou o menor efeito antioxidante sobre a formação do TBARS em todos os haplótipos com exceção do paciente SEN/SEN. A quercetina foi o mais eficiente, com ação dose-dependente, seguida da rutina e da miricetina. Os pacientes do haplótipo BEN/BEN apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo AA em todas as concentrações de todos os flavonoides testados, o que pode indicar que nestes pacientes os polifenóis foram menos eficientes na proteção contra a peroxidação lipídica. Os eritrócitos dos pacientes do haplótipo BEN/BEN praticamente não apresentaram o efeito protetor dos flavonoides. Em todos os polifenóis testados, as médias do TBARS foram maiores neste haplótipo (Tabela 6). A quercetina 100 $\mu\text{moles/l}$ foi capaz de inibir a formação de TBARS em níveis próximos aos encontrados no grupo AA, com a ressalva de que no grupo BEN/BEN, os valores encontrados foram significativamente mais altos, sugerindo resistência ao efeito antioxidante da quercetina. Em relação aos outros flavonoides testados, observou-se graus variados de proteção contra a formação de TBARS, com diferenças estatisticamente significativas entre o grupo AA e os haplótipos BEN/BEN, BAN/BAN e BEN/BAN. Os resultados encontrados nos haplótipos BEN/BEN e SEN/SEN devem ser analisados com cautela, ao se considerar o reduzido tamanho amostral, mas podem sugerir uma tendência de comportamento.

6.7 GSH/METAHEMOGLOBINA

Para a interpretação dos resultados concernentes à metahemoglobina, é necessário analisar a metodologia utilizada. A dosagem de metahemoglobina por espectrometria UV/VIS, utilizada no presente estudo, proposta por Naoum (2004), difere da tradicional determinação proposta por Evelyn e Malloy (1938), que utiliza para a formação da metahemoglobina uma solução de ferrocianeto de potássio. Sem a ação de interferentes químicos ou enzimáticos, a técnica de Naoum demonstra alta especificidade, baixa interferência química, baixo custo operacional, elevadas sensibilidade e reprodutibilidade, além do baixo risco de toxicidade ao ambiente laboratorial, o que ratificou sua escolha como metodologia de dosagem no presente estudo. Portanto, a análise crítica dos resultados deve respeitar esta informação, pois pela técnica de Evelyn e Malloy, os valores de referência são de até 1%, enquanto pelo método de Naoum, são de 1,9 a 3,8%.

Como já havia sido verificado pela análise da formação de TBARS e da porcentagem de hemólise, os eritrócitos do grupo SS demonstraram maior tendência oxidativa também pela avaliação da dosagem de metahemoglobina. Os valores obtidos para o grupo AA comparados com os do grupo SS foram diferentes de maneira significativa ($p < 0,05$) tanto no estado basal ($3,44 \pm 0,38\%$ versus $4,45 \pm 1,10\%$), quanto pela ação do agente oxidante *t*-BHP 1 mmol/l ($5,52 \pm 1,77\%$ versus $10,15 \pm 4,12\%$).

A exposição ao *t*-BHP causa oxidação da hemoglobina e peroxidação da membrana lipídica, por reações catalisadas pelo heme. Entre as ações exercidas pelo *t*-BHP aponta-se: desequilíbrio da homeostase do cálcio intracelular; oxidação da glutatona reduzida e das proteínas com grupos tiol da célula; quebra da cadeia do DNA; peroxidação lipídica e diminuição da mobilidade intraglobular das proteínas da membrana (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

A metahemoglobina tem papel importante nas ações oxidativas do *t*-BHP, pois é relatada a sua ação catalisadora sobre a cisão homolítica das ligações oxigênio-oxigênio na molécula do *t*-BHP, com consequente formação de radicais hidroxil (OH^\cdot), o que inicia uma série de reações oxidativas, como a peroxidação da membrana lipídica dos eritrócitos (BENATTI *et al.*, 1982).

Recentemente foi proposto um modelo bioquímico de hemólise que possui duas etapas: uma chamada de sensibilização e outra de lise propriamente dita. A conversão da hemoglobina para metahemoglobina inicia o processo de sensibilização, importante para eventos subsequentes que levarão à hemólise. A metahemoglobina, devido a sua “pseudo” atividade peroxidase, aumenta a produção de ERO no interior do eritrócito, no processo de sensibilização, ocasionando o estresse oxidativo na célula, o que pode ser observado através de mudanças no citoesqueleto da membrana eritrocitária. A partir desta fase, o eritrócito torna-se mais vulnerável para sua eliminação pelo sistema imune, com consequente hemólise. A lise do eritrócito libera hemoglobina e metahemoglobina, que iniciam outro ciclo para amplificar o processo hemolítico. Desta forma, a metahemoglobina é um mediador na formação de ERO, importante para a hemólise (BALAJI; TRIVEDI, 2012).

No presente estudo, nenhum flavonoide apresentou efeito protetor sobre a produção de metahemoglobina pela ação do *t*-BHP. As médias e desvios padrão da dosagem da metahemoglobina estão apresentados na Tabela 7. A Figura 55 ilustra o comportamento entre os grupos AA e SS.

Estratificando o grupo SS em seus haplótipos no estado basal, o subgrupo BAN/BAN foi o único que apresentou diferença significativa em relação ao grupo AA. Pela ação do *t*-BHP, houve diferenças estatisticamente significantes dos grupos BEN/BAN e BAN/BAN em relação ao grupo controle. Estes resultados podem indicar uma maior tendência ao estresse oxidativo nestes haplótipos em relação aos outros subgrupos estudados. Analisando-se o efeito protetor dos flavonoides nos respectivos haplótipos da anemia falciforme deste estudo, também não foi verificada nenhuma atividade antioxidante significativa destes compostos em relação à formação de metahemoglobina (Figuras 56 a 59).

Da mesma maneira que a metahemoglobina, o *t*-BHP tem efeito marcante sobre a GSH, sendo um modelo de agente oxidante que causa depleção do GSH intracelular, produzindo significativo processo hemolítico (BENATTI *et al.*, 1982). Este peptídeo está presente em espécies aeróbias e seu papel intracelular inclui a desintoxicação de xenobióticos e de ERO. A falha nesta função resulta na formação de metahemoglobina e consequente incapacidade do eritrócito em transportar oxigênio (VASCONCELOS, 2007).

Os pacientes com anemia falciforme possuem tendência a apresentar menores concentrações de GSH eritrocitária (ASLAN; THORNLEY-BROWN;

FREEMAN, 2000; CHAVES; LEONART; DO NASCIMENTO, 2008). No presente estudo, esta tendência não foi observada, pois não houve diferença significativa entre os grupos AA e SS (Figura 60). Na literatura existem valores discordantes sobre o comportamento da GSH na anemia falciforme. Rice-Evans *et al.* (1986) também não encontraram diferenças na concentração de GSH na anemia falciforme comparados a indivíduos normais. Esta variabilidade de resultados poderia ser explicada pela heterogeneidade laboratorial para a determinação da GSH e pela grande diversidade clínica de pacientes com anemia falciforme, incluindo os diversos haplótipos já descritos. No presente estudo, os pacientes do grupo SS foram tratados com HU, o que pode ter influenciado os resultados encontrados.

A determinação dos níveis de GSH em eritrócitos de pacientes de anemia falciforme tem sido utilizada como marcador do estresse oxidativo nestes pacientes. Acredita-se que a glutathione interage com a hemoglobina, formando um complexo que impede a polimerização da HbS, além de ser um potente sequestrador de radicais livres, melhorando aspectos clínicos da doença (GIZI *et al.*, 2011). Baseado nos resultados encontrados em relação à detecção de ERO, pode-se presumir que a HU tem influência sobre a formação destes radicais livres, possivelmente inibindo em graus variados a sua produção, o que poderia ter algum efeito sobre a GSH. Como não se analisou neste trabalho o perfil da GSH antes da utilização da HU, tais conjecturas ficam restritas ao campo das hipóteses.

Outra explicação para a variação dos níveis de GSH na anemia falciforme está correlacionada à presença de polimorfismos, como demonstrado por Silva e colaboradores (SILVA *et al.*, 2011), com diferenças significativas dos níveis de GSH entre pacientes da doença que possuíam diferentes polimorfismos para a enzima GST. Desta maneira, deve-se considerar outros mecanismos de controle da síntese de GSH.

Analisando-se a ação do *t*-BHP sobre a GSH observada neste trabalho, houve um grande consumo deste substrato, num período de incubação de 15 minutos. Tanto no grupo AA quanto no SS, o consumo da GSH foi praticamente total, o que comprova a sua depleção pelo *t*-BHP. Não houve diferença significativa no consumo do *t*-BHP entre o grupo AA e SS e, com relação a ação protetora dos flavonoides, não foi demonstrada nenhuma atividade antioxidante (Figura 60).

A ação protetora dos flavonoides depende do grau de associação destes com as células e com suas biomembranas, sendo influenciada pela capacidade de

entrada no citosol, o que varia muito entre os diversos flavonoides encontrados na natureza (LOPEZ-REVUELTA *et al.*, 2006). Tem sido descrito que a quercetina possui maior capacidade de penetração na membrana eritrocitária do que a rutina (CESQUINI *et al.*, 2003).

Os flavonoides podem causar diminuição da fluidez da região hidrofóbica da membrana, impedindo a difusão de radicais livres, inibindo assim os danos oxidativos. A quercetina parece se incorporar mais na região hidrofóbica enquanto a rutina se localiza na superfície externa na membrana eritrocitária. Como a quercetina e a rutina têm ação preferencial em nível de membrana eritrocitária, baixas concentrações destes polifenóis tem acesso ao citosol da célula, não demonstrando efeito contra a oxidação da hemoglobina e do GSH. A atividade antioxidante da maioria dos flavonoides está relacionada a sua estrutura química, principalmente à característica do açúcar ligado ao esqueleto básico dos flavonoides. Na rutina, o grupo hidroxil da posição 3 é substituído por um açúcar, o que pode explicar a menor capacidade quelante do ferro em relação à quercetina. Além disto, a rutina apresenta menor capacidade de penetrar em biomembranas quando comparada à quercetina, o que pode ser novamente explicado pela presença do açúcar em sua estrutura (LOPEZ-REVUELTA *et al.*, 2006).

Portanto, os resultados apresentados com relação à ação protetora dos flavonoides contra o consumo do GSH pelo *t*-BHP podem ser explicados pela pequena quantidade dos flavonoides no citosol dos eritrócitos, impedindo sua atividade antioxidante. O raciocínio relatado na literatura com relação à quercetina e à rutina poderia ser utilizado para a miricetina e a hesperidina, visto que nenhum dos polifenóis estudados apresentaram efeito sobre o consumo do GSH.

Estratificando o grupo SS em seus haplótipos, os subgrupos BEN/BEN e SEN/SEN apresentaram diferenças significativas para GSH no estado basal comparados a outros haplótipos e o grupo AA. Pela ação do *t*-BHP, o consumo produzido foi semelhante para os haplótipos. Porém no haplótipo SEN/SEN, observou-se manutenção de cerca de 50% dos níveis de GSH pela ação dos flavonoides, ou seja, o consumo do substrato foi menor. Por ser o perfil de um único paciente, estes resultados devem ser avaliados com ressalvas.

Outro campo de explicação para a variabilidade do comportamento da GSH na anemia falciforme está relacionado à capacidade dos eritrócitos re-sintetizarem o GSH. Os eritrócitos podem sintetizar o GSH a partir de cisteína, glicina e ácido

glutâmico, sendo que uma significativa quantidade de GSH pode ser produzida por este processo, denominado re-síntese ou síntese *de novo*. Este mecanismo é responsável pelo equilíbrio do GSH, mantendo adequado o *pool* de GSH, tanto plasmático quanto eritrocitário. Anormalidades nos eritrócitos podem prejudicar a re-síntese do GSH, prejudicando o mecanismo de *feedback* descrito acima (SILVA *et al.*, 2011). Pacientes de anemia falciforme podem ter sua capacidade de re-síntese prejudicada pela diminuição da biodisponibilidade de glutaminas ou pela diminuição do suprimento de cisteína (RUSANOVA *et al.*, 2010).

Rusanova *et al* (2010), avaliando crianças com anemia falciforme, encontraram altas concentrações de GSH em relação a crianças normais, comprovando mais uma vez a heterogeneidade deste parâmetro na doença. Porém, estudando o ciclo de enzimas da GSH, como GSHPx e GR, foram encontrados altas concentrações de GSHPx e baixas concentrações de GR, demonstrando tendência dos eritrócitos falciformes para o estresse oxidativo.

Em resumo, os flavonoides não apresentaram capacidade protetora em relação à formação de metahemoglobina e ao consumo do GSH pelo *t*-BHP, o que pode ser explicado pela pequena penetração destes compostos no citosol dos eritrócitos. Na maioria dos haplótipos, com exceção do SEN/SEN, não foram observadas diferenças de atividade antioxidante dos polifenóis. Pelo perfil apresentado no haplótipo SEN/SEN, estudos com um número maior de pacientes se faz necessário para a comprovação dos resultados aqui apresentados.

6.8 GLICOSE 6 FOSFATO DESIDROGENASE (G6-PD)

Alterações da via das pentoses e do metabolismo da glutathione dão origem a síndromes hemolíticas que têm em comum a geração comprometida de GSH e, como resultado, a desnaturação oxidativa da hemoglobina e de outras proteínas dos eritrócitos. A G6-PD tem como função essencial a redução da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) a NADPH, necessária para a redução da GSSG a GSH. O gene que determina a G6-PD está localizado no cromossomo X, com estrutura contendo 13 éxons, que codificam uma proteína de 515 aminoácidos. A deficiência de G6-PD é o distúrbio metabólico mais comum nos eritrócitos, tendo distribuição global, porém com maior incidência nas zonas tropical e subtropical do

hemisfério oriental. A incidência da deficiência da G6-PD é de aproximadamente 20% nos negros africanos de aldeias denominadas BAN, 12% nos negros americanos e 8% nos negros brasileiros. Devido à alta incidência da deficiência de G6-PD em regiões endêmicas de malária, considera-se que esta deficiência confere uma vantagem seletiva contra a infecção. Poucos levantamentos populacionais têm considerado os polimorfismos genéticos da deficiência de G6-PD, mas tem sido sugerido que na África a deficiência é resultado da variante denominada A- e que, nos países do Mediterrâneo, é resultado do polimorfismo denominado Mediterrânea (LUKENS, 1998; LUKENS; LEE, 1998)).

Analisando o comportamento da atividade da G6-PD nos grupos AA e SS, a grupo SS apresentou maior atividade ($p > 0,05$). Os valores do grupo AA foram $6,3 \pm 0,9$ mU/gHb e do grupo SS, $13,0 \pm 4,8$ mU/gHb. Apesar de não se determinar a porcentagem de reticulócitos nas amostras dos pacientes do grupo SS, a contagem de reticulócitos sabidamente é de cerca de 10% na anemia falciforme (BELISARIO, 2010; SANTOS *et al.*, 2012). Desta forma, uma possível explicação da elevação da atividade da G6-PD no grupo SS poderia se basear na concentração de reticulócitos no sangue periférico destes pacientes, habitualmente elevada. A atividade da G6-PD cai exponencialmente com o amadurecimento dos eritrócitos, sendo conhecido o fato de que os reticulócitos apresentam valores de atividade desta enzima cerca de duas vezes maiores em relação aos eritrócitos maduros (LUKENS, 1998).

A possível relação entre a deficiência de G6PD e a anemia falciforme é alvo de vários estudos ao longo das últimas décadas. Lewis (1966) foi o primeiro a sugerir esta relação em Gana, enquanto estudos subsequentes realizados na Nigéria (LUZZATTO; ALLAN, 1968), Tanzânia (MARTI; SCHOEPP; GSELL, 1965) e em comunidades americanas de origem Africana (PIOMELLI; REINDORF; ARZANIAN, 1972) deram continuidade às pesquisas sobre esta interação.

A coexistência da deficiência da G6-PD e da anemia falciforme no seu estado homozigoto é assunto que tem gerado inúmeras controvérsias na literatura. Além disto, a interação destas duas condições hereditárias com a malária tem sido alvo de inúmeros debates. Mohammad *et al.* (1998) demonstraram frequência de 47% da deficiência da G6-PD em pacientes da hemoglobina S, enquanto em indivíduos com o genótipo AA esta frequência foi de 19%. El-Hazmi (1993) não encontrou a mesma relação em seu estudo na região oeste da Arábia Saudita. É importante ressaltar que os inúmeros dados a respeito da incidência das duas

condições são geralmente dados de estudos das regiões da Ásia, mais precisamente na península arábica, onde predominam o haplótipo Árabe-saudita da anemia falciforme, raramente encontrado na população brasileira.

Portanto, pode-se estabelecer que os resultados de G6-PD no presente trabalho foram obtidos de haplótipos oriundos das regiões africanas, menos relacionadas com a deficiência de G6-PD. Estratificando o grupo SS em seus haplótipos, houve diferença significativa entre estes grupos e o grupo AA. As médias de G6-PD quanto aos haplótipos, foram: $11,2 \pm 4,86$ mU/gHb para o grupo BEN/BAN; $14,4 \pm 4,80$ mU/gHb para o grupo BAN/BAN; $13,6 \pm 0,21$ mU/gHb para os dois pacientes BEN/BEN e 9,7 mU/gHb para o paciente SEN/SEN. Portanto, não foi verificada deficiência da G6-PD em nossos pacientes do grupo SS. O perfil dos haplótipos de nossa população poderia explicar a falta de relação entre a deficiência de G6-PD e a anemia falciforme nestes haplótipos. Por outro lado, tem sido relatado que o polimorfismo variante A- da deficiência da G6-PD, comum na África, apresenta atividade normal de G6-PD em seus reticulócitos, o que poderia levar à suposição de que esta condição se refletisse em nossos resultados (LUKENS, 1998).

A ação oxidante do *t*-BHP nos eritrócitos foi menor nos eritrócitos do grupo AA em comparação aos do grupo SS. A média da atividade basal da G6-PD no grupo AA foi de $6,39 \pm 0,90$ mU/gHb e, após a ação do *t*-BHP, caiu para $4,99 \pm 0,70$ mU/gHb, diferença que, apesar de estatisticamente significativa, foi muito menor do que a observada nos eritrócitos do grupo SS. Nos pacientes com anemia falciforme, o consumo da enzima foi de praticamente 60% ($13,0 \pm 4,75$ mU/gHb no estado basal para $5,25 \pm 2,84$ mU/gHb após a ação do *t*-BHP). A maior tendência oxidativa dos eritrócitos falciformes poderia ser sugerida para explicar este comportamento.

Os flavonoides testados não apresentaram efeito protetor contra a ação oxidante do *t*-BHP sobre a G6-PD. Não houve diferenças significativas entre os níveis de G6-PD após a ação do *t*-BHP e os níveis encontrados pela ação dos polifenóis em todos os haplótipos estudados, bem como no grupo AA. A pequena penetração dos flavonoides no citosol dos eritrócitos pode explicar este comportamento, mostrando o mesmo padrão verificado nas determinações de metahemoglobina e GSH.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no estudo de 29 pacientes de doença falciforme atendidos no HEMEPAR (grupo SS), em relação a 15 indivíduos normais (grupo AA), permitiram as seguintes conclusões:

(1) Na avaliação dos haplótipos do *cluster* do gene β -globínico da anemia falciforme observou-se o predomínio do haplótipo BAN (70%), seguido do subgrupo BEN (25,8%). Os níveis de HbF e os parâmetros hematológicos não foram influenciados pelos haplótipos.

(2) Na avaliação da ação oxidante de *t*-BHP houve maior formação de metahemoglobina e TBARS e maior consumo de G6-PD no grupo SS.

(3) Na avaliação da ação antioxidante da quercetina, rutina, miricetina e hesperidina sobre o metabolismo oxidativo pela ação oxidante do *t*-BHP e do AAPH, observou-se ação protetora principalmente na membrana eritrocitária, o que foi comprovado pela inibição da formação de ERO, TBARS e hemólise. Em relação à eficiência dos flavonoides, a quercetina e a rutina apresentaram o melhor efeito antioxidante, seguida da miricetina. A hesperidina foi o flavonoide de pior desempenho antioxidante. A possível pequena penetração dos flavonoides no citosol do eritrócito foi observada pela ausência de proteção contra o consumo de GSH e G6-PD e pela formação da metahemoglobina.

Os resultados obtidos no presente estudo devem ser analisados sob o ponto de vista da interferência da hidroxiureia (HU), visto que esta droga possui diversas ações metabólicas. Pela análise dos haplótipos, o comportamento foi semelhante, não sendo este um fator que aumenta ou diminui a ação dos polifenóis. A caracterização haplotípica associada ao estudo do efeito protetor de flavonoides sobre o estresse oxidativo em eritrócitos de pacientes de anemia falciforme abre novas perspectivas para a melhoria da qualidade de vida destes pacientes, incluindo o tratamento terapêutico e nutracêutico com antioxidantes.

REFERÊNCIAS

- ADAM, P. **Sociologia da Doença e da Medicina**. Bauru, São Paulo: EDUSC, 2001.
- ADORNO, E. V. M.-N., J.P.; LYRA,I.; ZANETTE,A.; SANTOS,L.F.O.; SEIXAS,M.O.; REIS,M.G.; GONÇALVES,M.S. Sequence change in the HS2-LCR and Gg-globin gene promoter region of sickle cell anemia patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 41, p. 3. 2008.
- AFANAS'EV, I. B. et al. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**. v. 38, n.11, p. 1763-9. 1989.
- AKINSHEYE, I. et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Blood**. v. 118, n.1, p. 19-27. 2011.
- AKINSHEYE, I. et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: Molecular characterization of the unusually high fetal hemoglobin phenotype in African Americans. **Am J Hematol**. v. p. 2011.
- AMER, J. Red Blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. **British Journal of Hematology**. v. 132, p. 103-113. 2005.
- ANTONARAKIS, S. E.; KAZAZIAN, H. H., JR.; ORKIN, S. H. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. **Human Genetics**. v. 69, n.1, p. 1-14. 1985.
- ASCHLEY-KOCH, A. Y., Q.; OLNEY,R.S. Sickle hemoglobin (HbS) Allele and sickle cell disease: a HuGE review. **Am J Epidemiol**. v. 151, n.9, p. 839-845. 2000.
- ASLAN, M.; CANATAN, D. Nitric oxide consumption by circulating neutrophils in sickle cell disease. **Febs Journal**. v. 274, p. 214-214. 2007.
- ASLAN, M.; FREEMAN, B. A. Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 43, n.11, p. 1469-1483. 2007a.
- ASLAN, M.; FREEMAN, B. A. Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. **Free Radic Biol Med**. v. 43, n.11, p. 1469-83. 2007b.

ASLAN, M.; THORNLEY-BROWN, D.; FREEMAN, B. A. Reactive species in sickle cell disease. **Reactive Oxygen Species: From Radiation to Molecular Biology**. v. 899, p. 375-391. 2000.

BAKANAY, S. M. et al. Mortality in sickle cell patients on hydroxyurea therapy. **Blood**. v. 105, n.2, p. 545-7. 2005.

BALAJI, S. N.; TRIVEDI, V. Extracellular Methemoglobin mediated Early ROS Spike Triggers Osmotic Fragility and RBC Destruction: An Insight into the Enhanced Hemolysis During Malaria. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**. v. 27, n.2, p. 178-185. 2012.

BANDEIRA, F. M. G. C. P., J.C.; CARVALHO, E.J.; ARAÚJO, A.S.; MELLO, M.R.B.; MACHADO, C. Hidroxiuréia em pacientes com síndromes falciformes acompanhados no Hospital Hemope, Recife-PE. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 26, n.3, p. 189-194. 2004.

BANERJEE, A. et al. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chem Biol Interact**. v. 174, n.2, p. 134-9. 2008.

BARRECA, D. et al. Influences of flavonoids on erythrocyte membrane and metabolic implication through anionic exchange modulation. **J Membr Biol**. v. 230, n.3, p. 163-71. 2009.

BELISARIO, A. R. M., M.L.; BRITO, A.M.S.; RODRIGUES, C.V.; SILVA, C.M.; VIANA, M.B. β -Globin Gene Cluster Haplotypes in a Cohort of 221 Children with Sickle Cell Anemia or $S\beta^0$ -Thalassemia and Their Association with Clinical and Hematological features. **Acta Haematol**. v. 124, p. 162-170. 2010.

BENATTI, U. et al. A methemoglobin-dependent and plasma-stimulated experimental model of oxidative hemolysis. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 106, n.4, p. 1183-1190. 1982.

BEUTLER, E. **Red Metabolism: a Manual of Biochemical methods**. 3^o edition. Orlando: Grune & Stratton: 1984.

BEUTLER, E. Disorders of hemoglobin structure: Sickle cell anemia and related abnormalities. In. **Hematology**: MacGraw-Hill Medical, 2006a. p.667.

BEUTLER, E. Disorders of red cells resulting from enzyme abnormalities. In: LICHTMAN, M. A. B., E.; KIPPS, T.J.; SELIGSOHN, U.; KAUSHANSKY, K.; PRCHAL, J.T. **Williasms: Hematology**. New York: McGraw-Hill, 2006b. p.603-631.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J Lab Clin Med**. v. 61, p. 882-8. 1963.

BLAINE MOORE, R. et al. Increased Susceptibility of Sickle Cell Membrane Ca^{+2} , Mg^{+2} , ATPase to *t*-Butylhydroperoxide: Protective Effects of Ascorbate and Desferal. **Blood**. v. 79, n.5, p. 1334-1341. 1992.

BLANC, L. et al. Control of erythrocyte membrane-skeletal cohesion by the spectrin-membrane linkage. **Biochemistry**. v. 49, n.21, p. 4516-23. 2010.

BROWNE, P.; SHALEV, O.; HEBBEL, R. P. The molecular pathobiology of cell membrane iron: the sickle red cell as a model. **Free Radic Biol Med**. v. 24, n.6, p. 1040-8. 1998.

CABRAL, C. H. K. S., E.S.S.; MEDEIROS, W.R.D.B.; FERNANDES, T.A.A.M.; KIMURA, E.M.; COSTA, F.F.; SONATI, M.F.; REBECCHI, I.M.M.; MEDEIROS, T.M.D. Determination of β s haplotypes in patients with sickle-cell anemia in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**. v. 34, n.3, p. 421-424. 2011.

CAI, Q.; RAHN, R. O.; ZHANG, R. Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. **Cancer Lett**. v. 119, n.1, p. 99-107. 1997.

CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A doença falciforme no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 29, p. 203-206. 2007.

CESQUINI, M. et al. t-BOOH-induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids. **Biomed Pharmacother**. v. 57, n.3-4, p. 124-9. 2003.

CHANG, T. L.; KAKHNIASHVILI, D. G.; GOODMAN, S. R. Spectrin's E2/E3 ubiquitin conjugating/ligating activity is diminished in sickle cells. **Am J Hematol**. v. 79, n.2, p. 89-96. 2005.

CHARACHES, S. T., M.L.; MOORE, R.D.; DOVER, G.J.; BARTON, F.B.; ECKERT, S.V.; MCMAHON, R.P.; BONDS, D.R. Effect of hidroxyurea on the frequency of painful crisis in sickle anemia. **The New England Journal of Medicine**. v. 332, p. 1317-1322. 1995.

CHAVES, M. A.; LEONART, M. S.; DO NASCIMENTO, A. J. Oxidative process in erythrocytes of individuals with hemoglobin S. **Hematology**. v. 13, n.3, p. 187-92. 2008.

CHO, C. S. et al. Hydroxyurea-Induced expression of glutathione peroxidase 1 in red blood cells of individuals with sickle cell anemia. **Antioxidant & Redox Signaling**. v. 13, n.1, p. 1-11. 2010.

COTELLE, N. B., J.L.; CATTEAU, J.P.; POMMERY, J.; WALLET, J.C.; GAYDOU, E.M. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. **Free Radic Biol Med**. v. 20, n.1, p. 35-43. 1996.

DAI, F. et al. Protective effects of flavonols and their glycosides against free radical-induced oxidative hemolysis of red blood cells. **Life Sciences**. v. 78, n.21, p. 2488-2493. 2006.

DASGUPTA, T. H., R.P.; KAUL, K.D. Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models. **Free Radic Biol Med**. v. 41, p. 1771-1780. 2006.

DESSYPRIS, E. N. Eritropoese. In: LEE, G. R. L., J.N.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W. **Wintrobe: Hematologia Clínica**. São Paulo: Editora Manole, 1998. p.139-164.

DINIZ, D. J. G., C. Anemia falciforme: um problema nosso. Uma abordagem bioética sobre a nova genética. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 19, p. 1761-1770. 2003.

DOMANSKI, A. V.; LAPSHINA, E. A.; ZADODNIK, I. B. Oxidative processes induced by tert-butyl hydroperoxide in human red blood cells: chemiluminescence studies. **Biochemistry**. v. 70, n.7, p. 761-769. 2005.

EL-HAZMI, M. A. F. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and sickle cell genes in two regions of Western Saudi Arabia. **Saudi Med**. v. 13, p. 251-254. 1993.

EPSTEIN, F. H. Pathogenesis and treatment of Sickle Cell Disease. **The New England Journal of Medicine**. v. 337, n.11, p. 762-769. 1997.

EVELYN, K. A.; MALLOY, H. T. Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobin in a single sample of blood. **J. Biol. Chem**. v. 126, p. 655-657. 1938.

FERRALI, M. et al. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. **FEBS Lett.** v. 416, n.2, p. 123-9. 1997.

FLEURY, M. K. Haplótipos do cluster da globina beta em pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro: Aspectos clínicos e laboratoriais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas.** v. 39, p. 89-93. 2007.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. **Food Chem Toxicol.** v. 33, n.12, p. 1061-80. 1995.

GALIZA NETO, G.; PITOMBEIRA, M. S. Aspectos Moleculares da anemia falciforme. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.** v. 39, p. 51-56. 2002.

GALIZA NETO, G. et al. Análise dos haplótipos do gene da β^s -globina no Ceará. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.** v. 41, n.5, p. 6. 2005.

GIZI, A. et al. Assessment of oxidative stress in patients with sickle cell disease: The glutathione system and the oxidant-antioxidant status. **Blood Cells Mol Dis.** v. 46, p. 220-225. 2011.

GONCALVES, M. S. et al. BetaS-haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v. 36, n.10, p. 1283-8. 2003.

GRINBERG, L. N.; RACHMILEWITZ, E. A.; NEWMARK, H. Protective effects of rutin against hemoglobin oxidation. **Biochemical Pharmacology.** v. 48, n.4, p. 643-9. 1994.

GUALANDRO, S. F. M. A associação anemia falciforme e hemoglobina fetal. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.** v. 31, n.6, p. 403-404. 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** New York: Oxford University Press, 1999.

HAPNER, C. D.; DEUSTER, P.; CHEN, Y. Inhibition of oxidative hemolysis by quercetin, but not other antioxidants. **Chemico-Biological Interactions.** v. 186, n.275-279, p. 2010.

HARRIS, J. R. **Blood Cell Biochemistry.** London: Plenum Press, 1991.

HEBBEL, R. P. Beyond Hemoglobin Polymerization - the Red-Blood-Cell Membrane and Sickle Disease Pathophysiology. **Blood**. v. 77, n.2, p. 214-237. 1991.

HEBBEL, R. P. et al. Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 85, n.1, p. 237-41. 1988.

HILL, A. et al. Protection of erythrocytes from human complement-mediated lysis by membrane-targeted recombinant soluble CD59: a new approach to PNH therapy. **Blood**. v. 107, n.5, p. 2131-7. 2006.

HILLMAN, R. S. F., C.A. **Manual da Série Vermelha**. São Paulo: Editora Santos, 2001.

HU, C.; KITTS, D. D. Studies on the antioxidant activity of Echinacea root extract. **J Agric Food Chem**. v. 48, n.5, p. 1466-72. 2000.

JAROLIM, P. et al. Effect of Hemoglobin Oxidation-Products on the Stability of Red-Cell Membrane Skeletons and the Associations of Skeletal Proteins - Correlation with a Release of Hemin. **Blood**. v. 76, n.10, p. 2125-2131. 1990.

JONES-LECOINTE, A. et al. Beta-globin gene cluster haplotypes and alpha-thalassemia in sickle cell disease patients from Trinidad. **Am J Hum Biol**. v. 20, n.3, p. 342-4. 2008.

JOVANOVIC, S. V. et al. Flavonoids as antioxidants. **J. Am. Chem. Soc.** v. 116, p. 4846-4851. 1994.

JUNIOR, E. B. S., D.G.H.; TORRES,L.S.; ALMEIDA,E.A.; CANÇADO,R.D.; CHIATTONE,C.; BONINI-DOMINGOS,C.R. Oxidative estress and antioxidant capacity in sickle cell anaemia patients receiving different treatments and medications for different periods of time. **Ann. Hematol**. v. 91, p. 479-489. 2012.

KALPANA, K. B.; SRINIVASAN, M.; MENON, V. P. Evaluation of antioxidant activity of hesperidin and its protective effect on H₂O₂ induced oxidative damage on pBR322 DNA and RBC cellular membrane. **Mol Cell Biochem**. v. 323, n.1-2, p. 21-9. 2009.

KAUL, D. K. et al. Inhibition of sickle red cell adhesion and vasoocclusion in the microcirculation by antioxidants. **Am.J.Physiol. Heart. Circ.Physiol**. v. 291, p. 167-175. 2006.

KINOSHITA, A. et al. Simulation study of methemoglobin reduction in erythrocytes - Differential contributions of two pathways to tolerance to oxidative stress. **Febs Journal**. v. 274, n.6, p. 1449-1458. 2007.

KONEIĆ, M. Z. B., M.; PERKOVIĆ, I.; ZORE, B. Antiradical, chelating and antioxidant activities of hydroxamic acids and hydroxyureas. **Molecules**. v. 16, p. 6232-6242. 2011.

KORNBERG, A.; HORECKER, B. L.; KAPLAN, N. O. **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press: 1955.

KOVACIC, P. Hydroxyurea (therapeutics and mechanism): metabolism, carbamoyl nitroso, nitroxyl, radicals, cell signaling and clinical applications. **Medical Hypotheses**. v. 76, n.1, p. 24-31. 2011.

KULOZIK, A. E. K., B.C.; SATAPATHY, B.E.; SERJEANT, G.R.; WEATHERALL, D.J. Fetal Hemoglobin levels and β^S Globin Haplotypes in an Indian Population With Sickle Disease. **Blood**. v. 69, n.6, p. 4. 1987.

LALLE, M. et al. Dematin, a component of the erythrocyte membrane skeleton, is internalized by the malaria parasite and associates with Plasmodium 14-3-3. **Journal of Biological Chemistry**. v. 286, n.2, p. 1227-36. 2011.

LAUGHTON, M. J. H., B.; EVANS, P.J.; HOULT, J.R.S. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. **Biochemical Pharmacology**. v. 38, n.17, p. 2859-2865. 1989.

LEE, G. R. L., J.N. **Wintrobe: Hematologia Clínica**. 9ª. São Paulo: Editora Manole, 1998.

LETTRE, G. et al. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 105, n.33, p. 11869-11874. 2008.

LEWIS, R. A.; KAY, R. W.; HATHORN, M. Sickle cell disease and glucose 6-phosphate dehydrogenase. **Acta Haematol**. v. 36, p. 399-411. 1966.

LIU, S. C. Y., S.J.; MEHTA, J.R.; NICHOLS, P.E.; BALLAS, S.K.; YACONO, P.W. Red Cell Membrane Remodeling in Sickle Cell Anemia. **J.Clin. Invest**. v. 97, n.1, p. 29-36. 1995.

LOHR, G. W.; WALLER, H. D. **Glucose-6-phosphate dehydrogenase: Methods of enzymatic analysis**. Varlay Chemie, Wheim: 1974.

LOPEZ-REVUELTA, A. et al. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. **Chem Biol Interact**. v. 161, n.1, p. 79-91. 2006.

LOPÉZ-REVUELTA, A. S.-G., J.I.; HERNANDEZ-HERNANDEZ,A.; SANCHEZ-YAGUE,J.; LLAINILLO,M. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. **Chemico-Biological Interactions**. v. 161, p. 79-92. 2006.

LUKENS, J. N. Deficiências de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase e Deficiências Relacionadas que envolvem a Via da Pentose Fosfato e metabolismo da Glutathiona. In: LEE, G. R.; BITHELL, T. C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J. W.; LUKENS, J. N. **Wintrobe:Hematologia Clínica**. São Paulo: Editora Manole, 1998. p.1101-1119.

LUZZATTO, L.; ALLAN, N. C. Relationship between the genes for glucose 6-phosphate dehydrogenase and for haemoglobin in a Nigeria population. **Nature**. v. 219, p. 1041-1042. 1968.

MACK, A. K.; KATO, G. J. Sick cell disease and nitric oxide: a paradigm shift? **Int J Biochem Cell Biol**. v. 38, n.8, p. 1237-43. 2006.

MAKAREN, A.; HENRY, D. C.; CANNON, J. W. **Clinical Chemistry – Principles and Techniques**. Harper and How, Hagerstown: Wilkerman Editors, 1974.

MANFREDINI, V. et al. Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in steady state. **Journal of the National Medical Association**. v. 100, n.8, p. 897-902. 2008.

MARTI, H. R.; SCHOEPP, K.; GSELL, O. R. Frequency of haemoglobin S and glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency in Southern Tanzania. **British Medicine Journal**. v. 1, p. 1476-1477. 1965.

MARTINES-FLORES, S. G.-G., J.; CULEBRAS,J.M.; TUNON,J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**. v. 17, p. 271-278. 2002.

MARTINEZ, V. et al. Grape epicatechin conjugates prevent erythrocyte membrane protein oxidation. **J Agric Food Chem**. v. 60, n.16, p. 4090-5. 2012.

MOHAMMAD, A. M.; ARDATL, K. O.; KOHARIK, M. B. Sick Cell Disease in Bahrain: Coexistence and interaction with Glucose-6-phosphate Dehydrogenase(G6PD) Deficiency. **Journal of Tropical Pediatrics**. v. 44, p. 70-72. 1998.

MOREL, I. et al. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. **Biochemical Pharmacology**. v. 45, n.1, p. 13-9. 1993.

MORIDANI, M. Y. et al. Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. **Free Radic Biol Med**. v. 34, n.2, p. 243-53. 2003.

MURADOR, P. D., E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitaria. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 29, n.2, p. 168-178. 2007.

MURALITHARAN, S.; KRISHNAMOORTHY, R.; NAGEL, R. L. β -Globin-like Gene Cluster Haplotypes in Hemoglobinopathies. In. **Hemoglobin Disorders** 2003. p.195-211.

NAOUM, P. **Hemoglobinopatias e Talassemias**. São Paulo: Editora Sarvier, 1997.

NAOUM, P. C. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 22, n.1, p. 17. 2000a.

NAOUM, P. C. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 22, p. 5-22. 2000b.

NAOUM, P. C. Dosagem espectrofotométrica de metaemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 26, p. 3. 2004.

NAOUM, P. C.; RADISPEL, J.; MORAES, M. S. Dosagem espectrofotométrica de metaemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 26, n.1, p. 19-22. 2004.

NETO, G. C. G. N.; PITOMBEIRA, M. S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 39, n.1, p. 5. 2002.

NUR, E. et al. Oxidative stress in sickle cell disease; pathophysiology and potential implications for management. **Am J Hematol**. v. 86, p. 484-489. 2011.

OLCHOWIK, E. et al. Stabilization of erythrocytes against oxidative and hypotonic stress by tannins isolated from sumac leaves (*Rhus typhina* L.) and grape seeds (*Vitis vinifera* L.). **Cell Mol Biol Lett.** v. 17, n.3, p. 333-48. 2012.

PAIVA E SILVA, R. B. R., A.S.; CASSORLA, M.S.R. . A anemia falciforme como problema de Saúde Pública no Brasil. . **Revista de Saúde Pública.** v. 27, n.1, p. 54-58. 1993.

PARK, Y. et al. Metabolic remodeling of the human red blood cell membrane. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 107, n.4, p. 1289-94. 2010.

PEÑUELA, O. A. Hemoglobina: Una Molécula modelo para el investigador. **Colombia Médica.** v. 36, n.3, p. 215-224. 2005.

PIOMELLI, S.; REINDORF, C. A.; ARZANIAN, M. T. Clinical and biochemical interactions of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency and sickle-cell anaemia. **New England Journal of Medicine.** v. 287, p. 213-217. 1972.

REES, D. C. W., T.N.; GLADWIN, M.T. Sickle-cell disease. **Lancet.** v. 376, p. 2018-2031. 2010.

RICE-EVANS, C.; OMORPHOS, S. C.; BAYSAL, E. Sickle cell membranes and oxidative damage. **Biochem J.** v. 237, n.1, p. 265-9. 1986.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic Biol Med.** v. 20, n.7, p. 933-56. 1996.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic. Biol. Med.** v. 20, p. 933-956. 1996.

ROMERO, W. E. R. R., G.F.S.; VILLALOBOS, C. Haplotipos de la hemoglobina S: importancia epidemiológica, antropológica y clínica. **Revista Panamericana de Salud Publica/Panamerican Journal of Public Health.** v. 3, p. 8. 1998.

RUSANOVA, I. et al. Oxidative stress status, clinical outcome, and β -globin gene cluster haplotypes in pediatric patients with sickle cell disease. **European Journal of Haematology.** v. 85, p. 529-537. 2010.

SALVAGGIO, J. E.; ARNOLD, C. A.; BANOV, C. H. Long-term anti-coagulation in sickle-cell disease. A clinical study. **N Engl J Med.** v. 269, p. 182-6. 1963.

SÁNCHEZ-GALLEGO, J. L. L.-R., A.;HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ,A.;SARDINA,J.L.,LÓPEZ-RUANO,G,SÁNCHEZ-YAGÜE,J.;LLANILLO,M. Comparative antioxidant capacities of quercetin and butylated hydroxyanisole in cholesterol-modified erythrocytes damaged by tert-butylhydroperoxide. **Food and Chemical Toxicology**. v. 49, p. 2212-2221. 2011.

SANS, J. D. L. E. M. K. F. F. C. M. D. F. S. M. Beta-Globin Gene Cluster Haplotypes in Afro-uruguayans from two geographical regions (South and North). **American Journal of Human Biology**. v. 22, p. 4. 2012.

SANTOS, B. S. C. et al. The Impact of Bs-Globin Haplotypes on Oxidative Stress in Patients with Sickle Cell Anemia in Steady State. **Archives of Medical Research**. v. 1730, p. 1-5. 2012.

SHENG, K.; SHARIFF, M.; HEBBEL, R. P. Comparative oxidation of hemoglobins A and S. **Blood**. v. 91, n.9, p. 3467-70. 1998.

SHI, J.-C. L. Y.-O. S. P. P. P. X. Oxidative stress and metal carcinogenesis. **Free Radic Biol Med**. v. 53, p. 742-757. 2012.

SILVA, D. G. et al. Relationship between oxidative stress, glutathione S-transferase polymorphisms and hydroxyurea treatment in sickle cell anemia. **Blood Cells Mol Dis**. v. 47, n.1, p. 23-8. 2011.

SILVA, J. N. et al. Efeito de flavonoides no estresse oxidante e foto-oxidante no eritrócito humano. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação**. v. 21, p. 7-28. 2006.

SILVA, M. C.; SHIMAUTI, E. L. T. Eficácia e toxicidade da hidroxiureia em crianças com anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 28, n.2, p. 144-148. 2006.

SILVEIRA, L. Considerações críticas e Metodológicas na Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio em Células Musculares durante Contrações. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**. v. 48, n.6, p. 812-822. 2004.

SIMÃO, A. N.; SUZUKAWA, A. A. Consumo de Oxigênio, estresse oxidativo e atividade de enzimas antioxidantes como ferramenta para estudo do mecanismo de injúria pré-hemolítica. **Interbio**. v. 1, n.1, p. 21-26. 2007.

STAMATOYANNOPOULOS, J. A. Future prospects for treatment of hemoglobinopathies. **West J Med**. v. 157, n.6, p. 631-6. 1992.

STEINBERG, M. H.; NAGEL, R. L.; BRUGNARA, C. Cellular effects of hydroxyurea in Hb SC disease. **Br J Haematol.** v. 98, n.4, p. 838-44. 1997.

STEINBERG, M. H. et al. Concordant Fetal Hemoglobin response to Hydroxyurea in Siblings with Sickle Cell Disease. **American Journal of Hematology.** v. 72, p. 121-126. 2003.

STOCKS, J.; DORMANDY, T. L. The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. **Br J Haematol.** v. 20, n.1, p. 95-111. 1971.

STUART, M. J.; NAGEL, R. L. Sickle-cell disease. **Lancet.** v. 364, n.9442, p. 1343-60. 2004.

TAKASU, J. et al. Aged garlic extract is a potential therapy for sickle-cell anemia. **Journal of Nutrition.** v. 136, n.3 Suppl, p. 803S-805S. 2006.

TAVAKKOLI, F. et al. Effects of hydroxyurea treatment on cerebral oxygenation in adult patients with sickle cell disease: an open-label pilot study. **Clin Ther.** v. 27, n.7, p. 1083-8. 2005.

TAYLOR, J. G. T. et al. Mutations and polymorphisms in hemoglobin genes and the risk of pulmonary hypertension and death in sickle cell disease. **Am J Hematol.** v. 83, n.1, p. 6-14. 2008.

TELEN, M. J. O Eritrócito Maduro. In: LEE, G. R. L., J.N. **Wintrobe:Hematologia Clinica.** Baltimore, 1998. p.103-138.

TELEN, M. J.; KAUFMAN, R. The Mature Erythrocyte. In. **Wintrobe's Clinical Hematology.** Baltimore, 1999. p.193-227.

THEIN, S. L. et al. Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. **Human Molecular Genetics.** v. 18, p. R216-R223. 2009.

TROTTA, R. J.; SULLIVAN, S. G.; STERN, A. Lipid peroxidation and haemoglobin degradation in red blood cells exposed to t-butyl hydroperoxide. The relative roles of haem- and glutathione-dependent decomposition of t-butyl hydroperoxide and membrane lipid hydroperoxides in lipid peroxidation and haemolysis. **Biochem J.** v. 212, n.3, p. 759-72. 1983.

UZUNOVA, V. V. et al. Free heme and the polymerization of sickle cell hemoglobin. **Biophys J.** v. 99, n.6, p. 1976-85. 2010.

VALDATI, K. D.; HENNEBERG, R.; DO NASCIMENTO, A. J. Hematological reference ranges among healthy adults of Curitiba, PR, Brazil. **Rev Bras Hematol Hemoter**. v. 33, n.5, p. 395-6. 2011.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**. v. 39, n.1, p. 44-84. 2007.

VASCONCELOS, S. M. L. G., M.O.F.; MOURA, J.B.F.; BENFATO, V.M.M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**. v. 30, n.5, p. 1323-1338. 2007.

VICARI, P. M., A.B.; FIGUEIREDO, M.S. . Effects of Hidroxyurea in a Population of Brazilian Patients With Sickle Anemia. . **The American Journal of Hematology**. v. 78, p. 243-244. 2005.

VICHINSKY, E. New therapies in sickle cell disease. **Lancet**. v. 360, n.9333, p. 629-31. 2002.

VIVES CORRONS, J. L. Introduccion al estudio de la patología eritrocitaria. Bases Bioquímicas y fisiológicas. In: SANS-SABRAFEN, J. **Hematología Clínica**. Madrid: Mosby/Doyma libros, 1994. p.80-97.

WATANABE, A. M. et al. Prevalência da hemoglobina S no Estado do Paraná, Brasil, obtida por triagem neonatal. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 24, n.5, p. 993-1000. 2008.

WAUGH, S. M. et al. Heinz bodies induce clustering of band 3, glycophorin, and ankyrin in sickle cell erythrocytes. **J Clin Invest**. v. 78, n.5, p. 1155-60. 1986.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. Genetic disorders of hemoglobin. **Seminars in Hematology**. v. 36, n.4 Suppl 7, p. 24-37. 1999.

WEINER, D. L. et al. Preliminary assessment of inhaled nitric oxide for acute vaso-occlusive crisis in pediatric patients with sickle cell disease. **JAMA**. v. 289, n.9, p. 1136-42. 2003.

WILBER, A.; NIENHUIS, A. W.; PERSONS, D. A. Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: new therapeutic opportunities. **Blood**. v. 117, n.15, p. 3945-53. 2011.

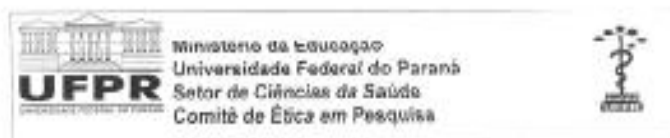
WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochem J.** v. 313 (Pt 1), p. 17-29. 1996.

WOLTERS, H. J. et al. Low-intensity oral anticoagulation in sickle-cell disease reverses the prethrombotic state: promises for treatment? **Br J Haematol.** v. 90, n.3, p. 715-7. 1995.

YANG, H. L. et al. Protection from oxidative damage using Bidens pilosa extracts in normal human erythrocytes. **Food Chem Toxicol.** v. 44, n.9, p. 1513-21. 2006.

ANEXO 1

TERMO DE APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA



Curitiba, 28 de outubro de 2009.

Ilmo(a) Sr.(a)
Raulson Henneberg

Nesta

Prezado(a) Pesquisador(a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Estudo do efeito antioxidante de polifenóis em eritrócitos de portadores hemoglobina S" está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 26 de agosto de 2009 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 28 de outubro de 2009.

Registro CEPISD: 778.113.09.08 CAAE: 0048.0.001.000-08

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentadas a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório final ou parcial: 29/04/2010.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Lílania Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

Prof. Dra. Lílania Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa - SCSS/UFPR



Rua Padre Cícero, 340 - Alameda Itália - Curitiba/PR - CEP: 80060-900
Fone: (41) 3262-7292 - e-mail: lmlabronici@ufpr.br



ANEXOS

ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto:

ESTUDO DO EFEITO ANTIOXIDANTE DE POLIFENÓIS EM ERITRÓCITOS DE PACIENTES DE HEMOGLOBINA S

Investigador responsável: Prof. Railson Henneberg – Professor do Departamento de Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná.

Local da pesquisa: Laboratório Clínico Escola e Laboratório de Citologia e Hematologia Clínica do curso de Farmácia da UFPR.

Contato: Priscila (41) 3360-4084 (41) 9621-0918. Av. Lothario Meissner, 632 – Jardim Botânico – CEP 80.210-170. Segunda a sexta-feira das 14:00 às 18:00

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto “**Estudo do efeito antioxidante de polifenóis em eritrócitos de pacientes de hemoglobina S**” sob a responsabilidade do pesquisador Railson Henneberg. Este projeto tem por objetivo estudar o efeito de 4 flavonoides, que são substâncias encontradas na natureza que possuem efeito benéfico em algumas doenças, como no anemia falciforme. Estes compostos não trazem prejuízos a saúde, visto que são naturais, e seu estudo pode trazer uma nova forma de tratamento para a anemia falciforme, bem como a melhoria da qualidade de vida e mesmo da sobrevida destes pacientes. Você é livre para aceitar ou recusar-se a participar deste estudo. Caso você aceite participar, o tratamento em curso com o seu médico continuará exatamente o mesmo, não havendo nenhuma possibilidade de uso de placebo ou qualquer outra alteração. O único desconforto será a coleta de seu sangue ou do paciente pelo qual é responsável, como já ocorre para os exames de rotina feitos no HEMEPAR, com a punção de cerca de 10 ml a mais para a realização dos testes que envolvem estudo da anemia hemolítica nesta pesquisa. Assim, não haverá nenhum desconforto adicional. Não haverá benefício direto aos voluntários, mas sim indiretos, por

proporcionar avanços científicos relacionados ao conhecimento da doença e dos tratamentos em questão.

Reafirmamos que sua participação nesse estudo é voluntária. Você pode se recusar a participar ou retirar seu consentimento sem penalização, a qualquer momento. Você não receberá nenhum benefício financeiro e nem terá de pagar qualquer valor pela participação no estudo.

Todos os dados coletados serão mantidos de forma confidencial e serão usados para a avaliação do estudo. As identidades serão substituídas por códigos mantendo a confidencialidade. Membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância.

Se tiver qualquer dúvida com relação ao estudo, você poderá entrar em contato com o pesquisador Railson Henneberg pelos telefones 3360-4084 ou 91188737, no Laboratório de Citologia e Hematologia ou no Laboratório Clínico Escola do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná das 14 às 18 horas de segunda a sexta-feira, e poderá receber esclarecimentos de forma detalhada sobre o andamento da pesquisa. Estão garantidas todas as informações que você queira, antes, durante ou depois do estudo.

Eu li e discuti com a investigadora responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que eu posso interromper minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito.

NOME DO PACIENTE	ASSINATURA	DATA
NOME DO RESPONSÁVEL	ASSINATURA	DATA
(Se menor ou incapacitado)		

APÊNDICE 1 - EXTRAÇÃO DO DNA

ETAPAS	AÇÕES
1	Coletar de 3 a 5 mL de sangue total em tubo de EDTA Centrifugar o tubo de sangue por 10 min a 4000 rpm Remover o plasma Separar o creme leucocitário (<i>buffy coat</i>)
2	Em tudo Eppendorf colocar 900 µl de TKM1 contendo NP-40 (ou Triton X-100) a 2,5% Adicionar 250 µl do <i>buffy coat</i> ; homogeneizar em vortex Centrifugar por 5 min a 10000 rpm Desprezar quase todo o sobrenadante, deixando aproximadamente 500 µl
3	*Completar o volume do tubo com TKM1 (sem NP-40 ou Triton X-100) Homogeneizar em vortex ; Centrifugar por 5 min a 10000 rpm Desprezar todo o sobrenadante * Repetir esta etapa até que o sedimento esteja limpo
4	Completar o volume do tubo com água ultra pura Homogeneizar em vortex; centrifugar por 5 min a 13000 rpm Desprezar todo o sobrenadante
5	Adicionar ao sedimento: 40 µl de tampão de proteinase K; 20 µl de proteinase K ; 10 µl de SDS 20%; 120 µl de água ultra pura Homogeneizar em vortex; colocar em banho-maria 65 °C por 40 min Em 20 min de banho-maria, homogeneizar novamente os tubos em vortex
6	Tirar os tubos do banho-maria e esfriar em temperatura ambiente Adicionar 100 µl de Cloreto de Sódio 6M Homogeneizar Centrifugar por 10 min a 13000 rpm
7	Transferir o SOBRENADANTE para um novo tubo Eppendorf Adicionar 700 µl de etanol absoluto; homogeneizar por inversão, centrifugar por 2 min a 13000 rpm. Desprezar sobrenadante
8	Adicionar 700 µl de etanol 70% Homogeneizar em vortex ; Centrifugar por 2 min a 13000 rpm Desprezar sobrenadante ; deixar os tubos secar em temperatura ambiente, estufa a 37 °C, ou em bloco de aquecimento a 65 °C
9	Depois de seco, reconstituir com 80 a 100 µl de água ultra pura Homogeneizar bem em vortex Deixar 1 hora a 65 °C

APÊNDICE 2- DADOS GRUPO SS

PAC.	RBC (/mm ³)	HGB (g/dl)	HCT (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	PLT (/mm ³)	WBC (/mm ³)	Haplótipos	HbF (%)	META (%)	GSH (μmol/l gHb)	G6PD (mU gHb)	TBARS (nmol gHb)
(1)	1,99	8,3	20,8	104,4	39,3	501	16400	BEN/BAN	4,6	3,7	6,6	9,75	23,7
(2)	2,31	8,9	22,9	99,5	38,8	329	7200	BEN/BAN	4	4,6	7,8	2,8	14
(3)	3,34	10,1	31,1	93	30,2	1184	7600	BEN/BAN	1,5	3,3	8,2	15,5	15,2
(4)	2,72	10,6	32,1	117,9	38,8	373	6700	BEN/BAN	12,3	4,3	7,6	5,58	28
(5)	3	8,8	27	90	29,3	268	12200	BEN/BAN	10,5	4,4	7,3	14,3	37,3
(6)	2,44	8,1	23,9	98	33,3	556	11100	BAN/BAN	6,4	7,1	9,4	18,9	5,57
(7)	2,43	9,8	28	115	40,1	384	15000	BEN/BAN	8,1	4,4	4,2	15,6	9,71
(8)	2,18	7,5	23	105	34,2	533	10700	BAN/BAN	11,9	4,4	11,1	14	22,2
(9)	3,99	11,1	36,8	92	28,7	365	7700	BAN/BAN	16,8	6,7	4	16,6	46,8
(10)	2,96	10,6	31,3	106	35,8	618	8300	BEN/BEN	9	3,2	8	13,8	18,3
(11)	2,16	9,1	27,7	128	42,1	496	7600	BEN/BAN	21,7	3,6	7,3	19,3	42,7
(12)	2,86	9,8	29,5	103	34,3	520	13900	BEN/BAN	4,7	3,8	4,9	9,9	54,8
(13)	2,58	9,5	29	112	36,9	371	11800	BAN/BAN	6,9	5	9,8	13,1	10,2
(14)	2,91	7,8	25,1	86	26,8	222	6800	BAN/BAN	11,3	3,5	7	14,2	40,3
(15)	2,85	11,8	35,1	123	41,5	294	5200	SEN/SEN	38,3	3,2	6,1	9,72	52,2
(16)	2,05	8	24,5	119	39,3	162	4300	BAN/BAN	26,7	3,9	10,8	19,5	14,2
(17)	1,73	7,9	22,9	132	45,3	458	4600	BAN/BAN	11,4	4,4	6	16,4	20,5
(18)	2,6	7,8	23	89	29,9	453	6600	BAN/BAN	7,3	5,1	5,9	6,9	30,5
(19)	3,86	9,1	29	75	23,6	685	13800	BAN/BAN	9	4,8	11	14,5	16,7
(20)	2,46	7,4	22,6	92	29,9	649	12300	BEN/BAN	10,3	4	6,4	11,1	9,49
(21)	3,07	9,9	28,8	94	32,3	710	15000	BAN/BAN	9,5	4,5	6,7	8,21	26,9
(22)	2,82	8	25,9	92	28,4	320	10000	BAN/BAN	12,7	7,4	9	25,5	90,4
(23)	2,25	7,2	21,3	95	32,2	523	21400	BAN/BAN	3,2	6	10,3	12,7	72,4
(24)	2,44	8,5	24,2	99	34,8	223	11400	BAN/BAN	2,5	3,7	6,6	10,7	10,2
(25)	3,04	8,8	26,7	88	29	555	11900	BAN/BAN	2	3,6	8,9	9	25
(26)	2,66	8	25,1	94	29,9	311	8100	BEN/BAN	11,1	4,2	10,4	12,9	44,6

(27)	2,64	7,9	25	94	30	712	9500	BEN/BAN	7,6	4,5	13,4	7,37	64,1
(28)	1,83	6,6	19	104	36,3	393	8900	BEN/BEN	10,2	4,1	5,8	13,5	64,1
(29)	3,21	8,8	27,5	86	27,5	141	2500	BAN/BAN	24,6	3,7	5,2	16	32

APÊNDICE 3 – DADOS GRUPO AA (CONTROLE)

	RBC (/mm ³)	HGB (g/dl)	HCT (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	PLT (/mm ³)	WBC (/mm ³)	HbF (%)	METAB (%)	GSH (μmol/l gHb)	G6PD (mU gHb)	TBARS (nmol gHb)
(1)	5,18	16,9	45,3	87,3	32,7	233	6400	1,8	3,4	5,4	4,56	21,4
(2)	6,18	18,5	49,7	80,4	29,9	231	4900	1,9	3,5	7,6	5,61	17,4
(3)	4,63	14,4	39,7	85,7	31,1	307	6700	0,3	3,9	8	6,11	20,6
(4)	4,97	16,4	45,1	90,7	33,1	305	9400	0,3	3,8	6,9	5,25	40,4
(5)	5,74	17,6	49,4	86,1	30,7	193	5800	1,3	3,9	6,6	5,73	44,3
(6)	4,15	13,1	38,1	91,8	31,6	192	6200	0,8	2,5	10,8	7,13	26,1
(7)	4,67	13,8	40	85,8	29,5	352	7900	0,4	3,8	10	7,31	11
(8)	4,17	13,4	37,5	90,1	32,1	174	8000	0,5	3,5	7,8	6,73	14,7
(9)	4,55	13,6	39,3	86,4	30	208	3800	0,9	3,7	8,7	7,52	64,1
(10)	4,17	13,9	37,8	90,6	33,3	242	5200	1,2	3	6,8	7,1	56,4
(11)	4,79	14,6	40,7	85	30,4	332	6300	1,5	3,3	8,3	7,58	10,8
(12)	4,5	15,3	39,3	88,1	32,1	222	10500	0,5	3,1	8,6	6,77	29,7
(13)	5,11	15,3	43,3	84,7	30	211	9600	1,4	3,3	8	6,26	34,7
(14)	6,07	18,6	51,5	84,9	30,6	320	8800	1,1	3,5	6,7	6,6	54,6
(15)	4,71	15	42,3	89,7	31,8	171	5100	1,8	3,4	9	5,56	27,1